

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年1 月17 日 (17.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/04626 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/37, 16/14, G01N 33/15, 33/50, A61K 39/395, 45/00, 31/4355, 31/4365, 31/437, 31/44, 31/472, 31/4725, 31/5377, A61P 31/10, C07D 213/16, 213/61, 213/65, 213/69, 213/74, 217/18, 217/20, 401/10, 401/12, 405/06, 405/10, 405/12, 471/04, 491/048, 491/056, 495/04, 498/04, 513/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05899

(22) 国際出願日: 2001 年7 月6 日 (06.07.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-206968 2000 年7 月7 日 (07.07.2000) JP
特願2000-316027
2000 年10 月17 日 (17.10.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4 丁目6 番10 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚原克平 (TSUKAHARA, Kappei) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4-4-24 Ibaraki (JP). 畑 桂 (HATA, Katsura) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代1-14-11 サンヒルズ松代405 Ibaraki (JP). 相根康司 (SAGANE, Koji) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県つくば市稲荷前9-7 つくばね第2寮303 Ibaraki (JP). 中本和孝 (NAKAMOTO, Kazutaka) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県つくば市稲荷前9-7 つくばね第2寮304 Ibaraki (JP). 土谷満美子 (TSUCHIYA, Mamiko) [JP/JP]; 〒300-1216 茨城県牛久市神谷6 丁目22-1 シエルヒーブB-103 Ibaraki (JP). 渡邊直彰 (WATANABE, Naoaki) [JP/JP]; 〒305-0053 茨城県つくば市小野川7-27 Ibaraki (JP). 大場史記 (OBA, Fuminori) [JP/JP]; 〒177-0045 東京都練馬区石神井台3-1-6-101 Tokyo (JP). 塚田格 (TSUKADA, Itaru) [JP/JP]; 〒300-1222 茨城県牛久市南3-11-13 Ibaraki (JP). 上田教博 (UEDA, Norihiro) [JP/JP]; 〒305-0861 茨城県つくば市谷田部1077-140 Ibaraki (JP). 田中圭悟 (TANAKA, Keigo) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代1-30-12 サンビレッジ松代F202 Ibaraki (JP). 甲斐純子 (KAI, Junko) [JP/JP]; 〒300-4118 茨城県新治郡新治村田土部2084-2 Ibaraki (JP).

[続葉有]

(54) Title: FUNGAL CELL WALL SYNTHESIS GENE

(54) 発明の名称: 真菌の細胞壁合成遺伝子

(57) Abstract: A reporter system reflecting the transport process of GPI anchor protein to cell wall is constructed and a compound inhibiting this process is found out. Further, a gene imparting tolerance to the above compound is identified and a method of screening a compound inhibiting the activity of the protein encoded by this gene is developed. Thus, it is clarified by the novel compound that antifungal agents depending on a novel mechanism, wherein the transport process of GPI anchor protein to cell wall is inhibited, are available.

(57) 要約:

本発明者らは、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を反映したレポータ系を作製し、その過程を阻害する化合物を見出した。更に該化合物に対し耐性を付与する遺伝子を同定し、該遺伝子がコードする蛋白質の活性を阻害する化合物のスクリーニング法を開発した。

本発明は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するという、新規メカニズムの抗真菌剤が可能であることを、新規化合物をもって示した。



WO 02/04626 A1



(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

真菌の細胞壁合成遺伝子

技術分野

本発明は、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNA、該DNAがコードする蛋白質、ある化合物がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を及ぼすか否かを検定する方法、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を及ぼす抗真菌剤に関する。

発明の背景

近年、高度な化学療法等により免疫機能の低下した患者や高齢者の増加により、日和見感染に対する対策は益々重要性を増してきている。カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス等による内臓真菌感染症はこうした日和見感染症の一部を占め、その割合は年々増加している。異なる弱毒菌による日和見感染が次々と起こっている事実は、患者の抵抗力が低下するような基礎疾患がある限り感染症の問題は後を絶たないことを示している。近い将来確実に訪れる高齢化社会においては、耐性菌の問題を含めた新たな感染症対策が重要な課題の一つとなるにもかかわらず、現状では有効な治療薬がきわめて少ない。

これまでの真菌感染症治療剤は既知の骨格に化学修飾し新規化合物を開発するストラテジーが中心であったが、耐性菌の問題もあり新規メカニズムに基づく新薬の開発が切望されている。

このような現状を踏まえ、発明者らは、未だ十分な治療薬が揃っていない抗真菌剤領域において「病原体が病原性を発揮できないようにすることにより、感染症の発症・進展・持続に対して効果を示す」という新

- 2 -

たなアプローチを試みた。感染を成立・進展させないためには、感染成立の第一段階である宿主への付着、およびその後のコロニゼーションの進展を抑えることが最も効果的であると考えた。そして、「付着因子自体の発現を阻害する」というこれまで行われていない新たなアプローチを実施することにした。

付着因子の発現を阻害するために、発明者らは、「付着因子等の細胞壁表層糖蛋白質は、一度細胞膜にGPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカリングした後、細胞壁表層に輸送される(図1)。」という仮説に着目した。現在までに付着リガンドを含む30種類以上の細胞壁表層糖蛋白質が、GPIアンカリングを介して輸送される(GPIアンカー蛋白質と称す)ことが明らかになっており、この輸送の段階を阻害すれば、付着因子および主要細胞壁構成蛋白の細胞壁表層での発現が阻害される可能性が高いと考えられた。(Hamada K et al, Mol. Gen. Genet., 258: 53-59, 1998)。また、病原性真菌であるカンジダにおいてもGPIアンカー蛋白質の存在が報告されていた(Kapteyn JC et al, Eur. J. Cell Biol., 65:402-407, 1994)。

発明者らは、真菌において細胞膜に存在するGPIアンカー蛋白質が、細胞壁に輸送される過程を阻害することにより、細胞壁合成の阻害による新規抗真菌剤が創出できると考えて、研究に着手した。

発明の開示

本発明の課題は、細胞壁表層糖蛋白質の発現を阻害し、細胞壁assemblyを阻害するとともに細胞への付着を阻害して、病原体が病原性を発揮できないようにすることにより、感染症の発症・進展・持続に対して効果を示す、抗真菌剤を開発することにある。

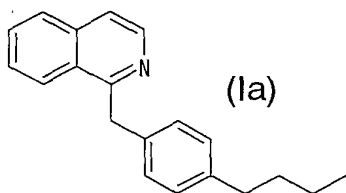
GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物をスクリ

- 3 -

ーニングするため、本発明者らは、GPIアンカー蛋白質の一つCWP2 (Van Der Vaat JM et al, J. Bacteriol., 177:3104-3110,1995) のC末端にある輸送シグナルとレポータ酵素の融合蛋白質によるレポータ系の作製を試みた。

分泌シグナル遺伝子+レポータ酵素遺伝子+CWP2のC末端遺伝子（有りor無し）から成るDNAを構築し、融合蛋白質を*Saccharomyces cerevisiae*（以下*S. cerevisiae*）に発現させたところ、レポータ酵素の活性が、CWP2のC末端が有る場合は細胞壁に、無い場合は培養上清中に見出されることが明らかとなった。この結果より、もし被検試料によってGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程が阻害されれば、細胞壁のレポータ酵素の活性が減少する、あるいはレポータ酵素の活性が培養上清中に見出されることが予想され、本レポータ系によるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物のスクリーニングを開始した。

本レポータ系によるスクリーニングより、幾つかのGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物が見出された。その代表的な例が、式（I a）で表される化合物である。



前記式（I a）で表される化合物は、*S. cerevisiae*及び*Candida albicans*（以下*C. albicans*）の増殖を抑制し、前記式（I a）で表される化合物存在下で培養した*C. albicans*は、細胞への付着能が弱く、前記式（I a）で表される化合物は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害することにより、付着因子の発現を抑制して真菌の付着を阻害するという、当初目的としていた化合物であることが確認された。更に

- 4 -

透過型電子顕微鏡による観察により、前記式（I a）で表される化合物存在下で培養した*C. albicans*は、細胞壁の合成に異常があることも確認された。

前記式（I a）に記載の化合物により、本発明者らは「GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する」というメカニズムによる抗真菌剤が可能であることを証明した。

本発明者らは、更に前記式（I a）で表される化合物が作用している標的蛋白質を特定するため、前記式（I a）で表される化合物に対し耐性を付与する遺伝子の探索を行った。

*S. cerevisiae*に、*S. cerevisiae*遺伝子のプラスミドライブラリーを導入し、過剰発現により、前記式（I a）で表される化合物に対して耐性を示すようになった*S. cerevisiae*よりプラスミドを回収して、耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定して、同遺伝子をGWT1と命名した（配列番号1）。GWT1遺伝子産物を過剰発現させた*S. cerevisiae*では、前記式（I a）で表される化合物存在下でも、前述のGPIアンカー蛋白質のC末端を有するレポータ酵素は、細胞壁へ輸送された。また、前記式（I a）で表される化合物存在下でも、細胞壁が正常であることが透過型電子顕微鏡観察において確認された。

更に、*S. cerevisiae*のゲノムDNA上にランダムに点突然変異を導入し、前記式（I a）で表される化合物特異的に耐性を示すようになった変異株R1、R5を単離したところ、R1変異株ではGWT1遺伝子の405番目のコドンがGTCからATCに、またR5変異株では140番目のコドンがGGGからAGGに変化する点突然変異が見出された。これら変異GWT1遺伝子をGWT1遺伝子破壊株に導入すると前記式（I a）で表される化合物に対して耐性を示すことから、この化合物に対する耐性はGWT1遺伝子のみで説明可能なことが明らかとなった。これらのことから、前記式（I a）で表される化合

- 5 -

物は、GWT1遺伝子産物に直接作用して、GWT1タンパク質の機能を阻害していることが示唆された。

同様な方法により、*C. albicans*の耐性遺伝子（配列番号3、及び5）もクローニングし塩基配列を決定し、同遺伝子をCaGWT1と命名した。

また、データベースからのGWT1とのホモロジー検索により、*Schizosaccharomyces pombe*（以下*S.pombe*）のホモログ（配列番号27）が見出された。更に、*S.cerevisiae*, *S.pombe*, *C.albicans*のGWT1遺伝子のコードする蛋白において、高度に保存されている領域の配列を基にプライマーを設定してPCRを行うことにより*Aspergillus fumigatus*（以下*A.fumigatus*）ホモログ（配列番号39、41）が見出された。また、データベースからのGWT1とのホモロジー検索により見出された配列を基にPCRを行って、*Cryptococcus neoformans*（以下*C.neoformans*）ホモログ（配列番号54、58）が見出された。

すなわち本発明は、

1. 真菌における過剰発現により、真菌に対し下記式（I a）で示される化合物に対する耐性を付与する作用を有する蛋白質をコードする、下記（a）から（e）のいずれかに記載のDNA。

（a）配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

（b）配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列を含むDNA。

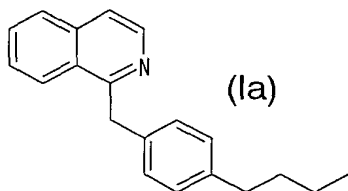
（c）配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

（d）配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／また

- 6 -

は挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(e) 配列番号：29及び31あるいは配列番号：29及び30をプライマーとして増幅されるDNA。



2. その機能の欠損により真菌の細胞壁におけるGPIアンカー蛋白質量を減少させる作用を有する蛋白質をコードする、下記(a)から(e)のいずれかに記載のDNA。

(a) 配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列を含むDNA。

(c) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(d) 配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(e) 配列番号：29及び31あるいは配列番号：29及び30をプライマーとして増幅されるDNA。

ここでストリンジェントな条件とは、例えば65℃ 4 x SSCにおけるハイブリダイゼーション、次いで65℃で1時間0.1 x SSC中での洗浄であ

- 7 -

る。また別法としてストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド中42℃
4 x SSCである。また、PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液中65℃2.5時間ハイブリダイゼーション、次いで1).2xSSC, 0.05% SDS溶液: 25℃5分、2).2 xSSC, 0.05% SDS溶液: 25℃15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50℃20分の洗浄といった条件も許される。

また該DNAを欠失するとは、機能を持った該DNAの遺伝子産物の発現が無い、あるいは発現が減少することを意味し、例えば相同組換えの技術を使って、該DNAのコード領域に無関係なDNA、例えば選択マーカ一等を挿入することにより、該DNAを欠失させることを意味する。

真菌細胞壁でのGPIアンカー蛋白質由来の蛋白質は、1).GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を反映したレポータ系、2).細胞壁中のGPIアンカー蛋白質の一種類を定量するELISA、3).動物細胞への付着といったGPIアンカー蛋白質の活性、4).透過型電子顕微鏡による菌体最外層の綿状線維構造の観察、により定量が可能であり、これらの方法を単独であるいは組合わせて用いることにより、該蛋白質が減少することが確認できる。

3. 1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質。

4. 1または2に記載のDNAが挿入されたベクター。

5. 1または2に記載のDNAまたは4に記載のベクターを保持する形質転換体。

6. 3に記載の蛋白質が過剰発現している真菌である、5に記載の形質転換体。

7. 3に記載の蛋白質の機能が欠損している真菌

8. 5に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、3に記載の蛋白質の製造方法。

- 8 -

9. 3に記載の蛋白質に結合する抗体。

10. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 3に記載の蛋白質に被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質と被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

11. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 3に記載の蛋白質が過剰発現している真菌に被検試料を接触させる工程、

(b) 該真菌におけるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量を検出する工程、

(c) 3に記載の蛋白質が過剰発現していない真菌に被検資料を接触させた場合と比較して、工程(b)において検出されるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量を減少させる化合物を選択する工程、を含む方法。

ここで被検試料によるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量の減少は、例えば増殖速度の低下、膨化、温度感受性、細胞壁でのGPIアンカー蛋白質由来の蛋白質の減少等により検出することが可能であるが、好ましくは、細胞壁でのGPIアンカー蛋白質由来の蛋白質の減少により検出することが望ましい。

GPIアンカー蛋白質由来の蛋白質の減少は、1). GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を反映したレポータ系、2). 細胞壁中のGPIアンカー蛋白質の一種類を定量するELISA、3). 動物細胞への付着といったGPIアンカー蛋白質の活性、4). 透過型電子顕微鏡による菌体最外層の綿状線維構造の観察、により定量が可能であり、これらの方法を単独であるいは組合わせて用いることにより、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量の減少が検定できる。

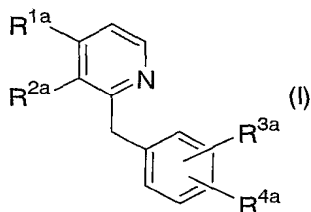
- 9 -

12. 前記10または11に記載のスクリーニングにより単離しうる、抗真菌作用を有する化合物。

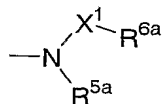
13. 真菌においてGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送を阻害する化合物を有効成分とする抗真菌剤。

14. 9に記載の抗体または前記12に記載の化合物を有効成分とする、抗真菌剤。

15. 一般式(I)



[式中 R^{1a} および R^{2a} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基、または式



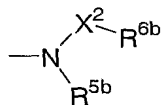
(式中 X^1 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5a} および R^{6a} は同一または相異なって、水素原子、または置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1a} と R^{2a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換

- 10 -

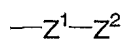
されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環、および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環を形成してもよい；

R^{3a} 、および R^{4a} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ （式中、 R^{7a} および R^{7b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、または C_{1-6} アルキル基を意味する）、式 $-CO_2R^{7a}$ （式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する）、式 $-S(O)_nR^{7a}$ （式中、 n は0ないし2の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する）、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ （式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する）、式



（式中 X^2 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5b} および R^{6b} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、または置換されていてもよい C_{6-14} アリール基を意味する）で表わされる基、または式



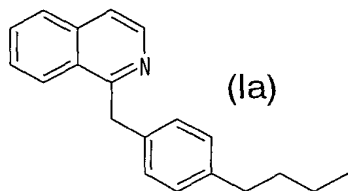
（式中、 Z^1 は単結合、酸素原子、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

Z^2 は単結合、または0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する）で表わされる基を意味する。 R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、

- 1 1 -

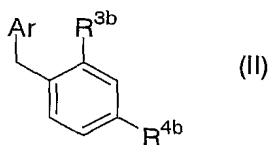
メチレンジオキシ基、または1,2-エチレンジオキシ基を意味してもよく、また R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環の形成を意味してもよい。ただし、 R^{1a} および R^{2a} がともに水素原子を意味する場合は除く。〕で示される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物を有効成分とする前記13.に記載の抗真菌剤。

16. 式



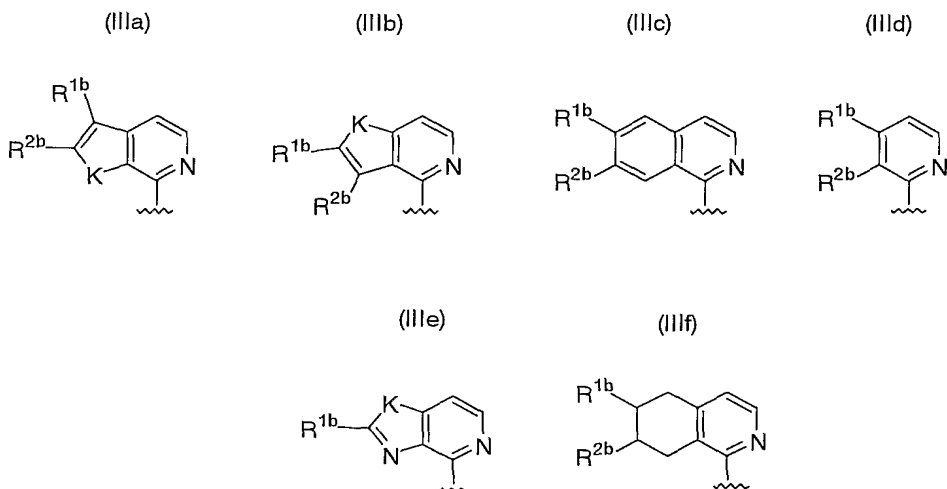
で表される化合物 (I a) を有効成分とする前記13.に記載の抗真菌剤。

17. 一般式(II)



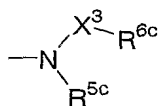
〔式中Arは下記式 (IIIa) - (IIIf) からなる群

- 1 2 -



(式中、Kは硫黄原子、酸素原子、または式 $-NH-$ で表わされる基を意味する；

R^{1b} 、 R^{2b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、式



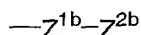
(式中 X^3 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5c} および R^{6c} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する)で表わされる基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する)で表わされる基を示す。また、 R^{1b} 、 R^{2b} は一緒になってメチレンジオキシ基、または1,2-エチレンジオキシ基を形成してもよい。)から選ばれる置換基を意味する；

R^{3b} 、および R^{4b} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒ

- 1 3 -

ドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、または式、

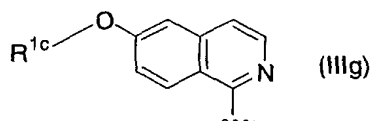


(式中、 Z^{1b} は単結合、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する； Z^{2b} は単結合、または0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する)で表わされる基を意味する。；

ただし(1) Arが、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子である前記式(IIIId)で表わされる場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、Arが、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する前記式(IIIc)で表わされる場合、

(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、Arが、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する前記式(IIIc)で表わされる場合、または(4) Arが、 R^{1b} が水素原子で R^{2b} がホルミル基、ヒドロキシメチル基またはメトキシカルボニル基である前記式(IIIId)で表わされる場合を除く。)で示される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

18. Arが式、

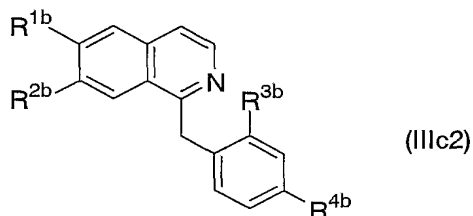


(式中、 R^{1c} が水素原子、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、ベンジル基を意味する)で表わされ、かつ R^{3b} が水素原子を意味する場合を除いた、

17. 記載の化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

- 14 -

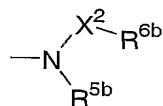
19. 一般式(IIIc2)



〔式中 R^{1b} 、 R^{2b} は前記定義と同意義を意味する。ただし、(1) R^{1b} が式 $R^{1c}-O-$ (式中、 R^{1c} は前記定義と同意義を意味する)で表わされる基であり、 R^{2b} が水素原子であり、 R^{3b} が水素原子を意味する場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する場合、または(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する場合を除く。〕で表される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

20. 抗真菌作用を有する前記17.記載の抗真菌剤

21. R^{3a} 、および R^{4a} のうち少なくとも1つが、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-CO_2R^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_nR^{7a}$ (式中、 n は0ないし2の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式



(式中 X^2 、 R^{5b} および R^{6b} は前記定義と同意義を意味する)で表わされる基、または0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基を意味し、または R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または1,2-

- 1 5 -

エチレンジオキシ基を意味する前記 1 5 . 記載の抗真菌剤

2 2 . 抗真菌作用を有する化合物が、(1) 1-ベンジルイソキノリン、(2) 1-(4-ブロモベンジル)イソキノリン、(3) 1-(4-クロロベンジル)イソキノリン、(4) 1-(4-フルオロベンジル)イソキノリン、(5) 1-(4-ヨードベンジル)イソキノリン、(6) 1-(3-メチルベンジル)イソキノリン、(7) 1-(4-メチルベンジル)イソキノリン、(8) 1-(3,4-ジメチルベンジル)イソキノリン、(9) 1-(3-メトキシベンジル)イソキノリン、(1 0) 1-(4-メトキシベンジル)イソキノリン、(1 1) 1-(3,4-メチレンジオキシベンジル)イソキノリン、(1 2) 1-(4-ベンジルオキシベンジル)イソキノリン、(1 3) 1-(4-シアノベンジル)イソキノリン、(1 4) 1-(4-ニトロベンジル)イソキノリン、(1 5) 1-(4-アミノベンジル)イソキノリン、(1 6) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-ジクロロイソキノリン、(1 7) 1-(4-メトキシ-2-ニトロ-ベンジル)-イソキノリン、(1 8) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-メチレンジオキシ-イソキノリン、(1 9) 1-(2-アミノ-4-メトキシ-ベンジル)イソキノリン、(2 0) 1-(4-メトキシベンジル)-7-ヒドロキシ-6-メトキシ-イソキノリン、(2 1) 1-(4-ベンジルオキシベンジル)-6,7-ジメトキシ-イソキノリン、(2 2) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-ジメトキシ-イソキノリン、(2 3) 1-(4-メトキシ-2-ニトロ-ベンジル)-イソキノリン、(2 4) 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]プロピルシアニド、(2 5) 1-[4-(2,2,3,3-テトラフルオロプロポキシ)ベンジル]イソキノリン、(2 6) 1-[4-(2-ピペリジノエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(2 7) 4-(1-イソキノリルメチル)フェニル(2-モルフォリノエチル)エーテル、(2 8) 1-[4-(2-メトキシエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(2 9) *N*-{2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]エチル}-*N,N*-ジメチルアミン、(3 0) 1-[4-(フェネチルオキシ)ベンジル]イソキノリン、(3 1) 1-{4-[(2

- 1 6 -

-メチルアリル)オキシ]ベンジル}イソキノリン、(32) 1-(4-イソブトキシベンジル)イソキノリン、(33) 1-[4-(2-フェノキシエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(34) メチル2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]アセテート、(35) 2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-エタノール、(36) *t*-ブチル *N*-{2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]エチル}カーバメート、(37) 1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)プロポキシ]ベンジル}イソキノリン、(38) 2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-エタンアミン、(39) 1-[4-(3-ピペリジノプロポキシ)ベンジル]イソキノリン、(40) 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-プロパノール、(41) 1-[4-(2-エチルブトキシ)ベンジル]イソキノリン、(42) 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]ブタノイックアシッド、(43) 1-(4-{3-[(4-ベンジルピペラジノ)スルフォニル]プロポキシ}ベンジル)イソキノリン、(44) 1-(4-{3-[4-(4-クロロフェニル)ピペラジノ]プロポキシ}ベンジル)イソキノリン、(45) 4-(1-イソキノリルメチル)アニリン、(46) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]ブタンアミド、(47) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパンアミド、(48) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-エタンスルフォンアミド、(49) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチル-エタンスルフォンアミド、(50) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチルアミン、(51) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-プロピルアミン、または(52) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチル-*N*-プロピルアミンである前記15. 記載の抗真菌剤

23. 治効量の請求項13から22のいずれかに記載の抗真菌剤を哺乳動物に投与することを含む、真菌感染症の治療方法、に関する。

以下に、本願明細書において記載する用語、記号等の意義を説明し、

- 17 -

本発明を詳細に説明する。

なお、本願明細書中においては、化合物の構造式が便宜上一定の異性体を表すことがあるが、本発明には化合物の構造上生ずる総ての幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体、互変異性体等の異性体および異性体混合物を含み、便宜上の式の記載に限定されるものではなく、いずれか一方の異性体でも混合物でもよい。従って、分子内に不斉炭素原子を有し光学活性体およびラセミ体が存在することがあり得るが、本発明においては特に限定されず、いずれの場合も含まれる。さらに結晶多形が存在することもあるが同様に限定されず、いずれかの結晶形単一または混合物であってもよく、また、無水物であっても水和物であってもどちらでもよい。

また本発明化合物が、生体内で酸化、還元、加水分解、または抱合などの代謝を受けて抗真菌作用を示す化合物も含有する。またさらに、本発明は生体内で酸化、還元、加水分解などの代謝を受けて本発明化合物を精製する化合物をも含有する。

本明細書中において表される「 C_{1-6} アルキル基」とは、炭素数1ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*i*-ペンチル基、ネオペンチル基、*n*-ヘキシル基、1-メチルプロピル基、1,2-ジメチルプロピル基、2-エチルプロピル基、1-メチル-2-エチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,1-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{2-6} アルケニル基」とは、炭素数2

- 18 -

ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルケニル基を意味し、具体的には例えばビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、1-ブテン-1-イル基、1-ブテン-2-イル基、1-ブテン-3-イル基、2-ブテン-1-イル基、2-ブテン-2-イル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{2-6} アルキニル基」とは、炭素数2ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキニル基を意味し、具体的には例えば、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{1-6} アルコキシ基」とは前記定義の「 C_{1-6} アルキル基」が結合したオキシ基であることを意味し、具体的には、例えばメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、*i*-ペンチルオキシ基、*sec*-ペンチルオキシ基、*t*-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1,1-ジメチルプロポキシ基、1,2-ジメチルプロポキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、*i*-ヘキシルオキシ基、1-メチルペンチルオキシ基、2-メチルペンチルオキシ基、3-メチルペンチルオキシ基、1,1-ジメチルブトキシ基、1,2-ジメチルブトキシ基、2,2-ジメチルブトキシ基、1,3-ジメチルブトキシ基、2,3-ジメチルブトキシ基、3,3-ジメチルブトキシ基、1-エチルブトキシ基、2-エチルブトキシ基、1,1,2-トリメチルプロポキシ基、1,2,2-トリメチルプロポキシ基、1-エチル-1-メチルプロポキシ基、1-エチル-2-メチルプロポキシ基などが挙げられる。

本明細書中において表される「 C_{6-14} アリール基」とは、炭素数6ないし14の芳香族環基をいい、具体的には例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、*as*-インダセニル基、*s*-インダセニル基、アセナフチレニル基などが挙げられる。

- 19 -

本明細書中において表わされる「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を意味する。

本明細書中において表わされる「置換されていてもよい」とは、「置換可能な部位に、任意に組み合わせて1または複数個の置換基を有してもよい」と同意義であり、置換基は具体的には例えば、水素原子、ハロゲン、ニトロ基、シアノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、 C_{2-7} アシルアミノ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、ピリジル基、 C_{1-6} アルキルスルフィニル基、 C_{1-6} アルキルスルフォニル基、 C_{1-6} アルキルスルファモイル基、 C_{1-6} アルキルスルフィナモイル基、 C_{1-6} アルキルスルフェナモイル基、テトラヒドロピラニル基、 C_{1-6} アルキルカルバモイル基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する)などが挙げられる。

本明細書中において表わされる「0ないし4個の置換基で置換されていてもよい」とは、「置換可能な部位に、任意に組み合わせて1または4個の置換基を有してもよい」と同意義であり、置換基は前記定義と同意義である。

本発明における「塩」とは薬理学的に許容される塩を示し、本発明化合物と付加塩を形成したものであれば特に限定されないが、好ましい例としては、フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；硫酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、リン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩などの無機酸塩；酢酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩などの有機カルボン酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスル

- 20 -

ホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩などの有機スルホン酸塩；アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などのアミノ酸塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、プロカイン塩、ピリジン塩、フェネチルベンジルアミン塩などのアミンとの塩；ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩等があげられる。

以下に本発明に記載された、1. 細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得る方法、2. 被検試料がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を及ぼすか否かを検定する方法、3. 前記式 (I a) の化合物を得る方法について開示する。

1. 真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得る方法

以下に、(1).真菌に過剰発現することにより、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する蛋白質をコードするDNAを得る方法、(2).配列番号 1、配列番号 3 あるいは配列番号 5 に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを得る方法、(3).ホモロジー検索を基に、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得る方法、(4). 前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する蛋白質を過剰発現、あるいは欠失した真菌を得る方法について述べる。

(1).真菌に過剰発現することにより、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する蛋白質をコードするDNAを得る方法

ここで真菌とは、接合菌・子囊菌・担子菌・不完全菌門に属すもので、好ましくは病原性真菌、*Mucor*・*Saccharomyces*・*Candida*・*Cryptococcus*・*Trichosporon*・*Malassezia*・*Aspergillus*・*Trichophyton*・*Microsporum*・*Sporothrix*・*Blastomyces*・*Coccidioides*・*Paracoccidioides*・*Penicillium*・*Fusarium*であり、更に好ましくは*C. albicans*・*C. glabrata*、*C. neoformans*及び*A. fumigatus*である。遺伝的な解析の容易な*S.*

- 2 1 -

*cerevisiae*及び*S. pombe*も好ましい菌種である。

真菌に、当該真菌遺伝子のプラスミドライブラリーを導入する。*S. cerevisiae*及び*S. pombe*のプラスミドライブラリーはATCC(Information for ATCC Number: 37323)から入手可能であり、*C. albicans*のプラスミドライブラリーはNavaro-Garcia F et al, Mol. Cell. Biol., 15: 2197-2206, 1995に記載の方法により作製可能である。得られたプラスミドライブラリーは、Gietz D et al, Nucl. Acids Res. 20: 1425, 1992に記載の方法により真菌に導入する。あるいは、YEASTMAKER™ Yeast Transformation System(Clontech)等のキットを使うことも許される。

プラスミドライブラリーを導入した真菌は、前記式(I a)に記載の化合物の存在下で培養する。具体的には、前記式(I a)に記載の化合物を $1.56\mu\text{g/ml}$ から $25\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $1.56\mu\text{g/ml}$ から $6.25\mu\text{g/ml}$ 、更に好ましくは $3.125\mu\text{g/ml}$ の濃度に含む寒天培地上にプラスミドライブラリーを導入した真菌を接種し、適当な時間、 30°C から 42°C で2日から5日、好ましくは 37°C で3日間培養する。増殖してきたコロニーを、前記式(I a)に記載の化合物を含む培地中で更に培養し、増殖させた菌体よりプラスミドを精製する。プラスミドの精製は、例えばMETHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 194: 169-182 (1991)に記載の方法に行うことができる。

得られたプラスミドは、好ましくは直接塩基配列を決定するが、必要であれば、適当なベクター、例えば塩基配列の決定に適したpBluescript II、pUC19等にリクローニングを行い、塩基配列を決定する。塩基配列の決定は、例えばABI377 system (PE applied Biosystems社製) マニュアルに記載の方法で行うことができる。

本発明の実施例においては、*S. cerevisiae*では独立に取得した27コロニーの全てが、*C. albicans*では30コロニー中28コロニーが、本発明

- 2 2 -

に記載のDNAを含んでいた。前記式 (I a) に記載の化合物に対して耐性を付与する遺伝子は、該真菌にただ一つ存在し、上記の方法により取得することが可能である。

(2). 配列番号 1、配列番号 3 あるいは配列番号 5 に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを得る方法

本発明に記載の、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得る方法としては、例えば *S. cerevisiae* の遺伝子DNAを鋳型とし、配列番号 1 に記載の塩基配列の情報よりプライマーを設計して、あるいは *C. albicans* の遺伝子DNAを鋳型とし、配列番号 3 あるいは配列番号 5 に記載の塩基配列の情報よりプライマーを設計して、PCRを行い、増幅されたDNAを適当なベクター、例えばpBlueScript等にクローニングすることにより得る方法が挙げられる。プライマーは増幅したい領域に応じて適宜設計するが、好ましくは15 bp以上、更に好ましくは20 bp以上の長さが望ましく、場合によっては制限酵素部位等、後のDNA構築に必要な配列を付加しても構わない。PCRの条件はプライマーの長さ、増幅する領域の長さ、用いる鋳型DNAの量等に合わせ適宜決定できる。例えば *C. albicans* の遺伝子DNA 200 ngを鋳型とし、配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 をプライマーとして94°C4分→(94°C30秒→68°C5分) x 35サイクル→72°C4分の条件で、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得ることができる。

PCRで得られたDNAは、細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAとホモロジーのある、他類の真菌のDNAを得るためのプローブとしても使用することができる。具体的には、例えば *S. cerevisiae* の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードする、*C. albicans* の相同遺伝子を得るために、*C. albicans* の遺伝子ライブラリーあるいはc-DNAライブラリーから、*S. cerevisiae* の遺伝子DNAを鋳型としてPCRで得られたDNAをプローブ

- 23 -

とし、ストリンジェントな条件で、ハイブリダイズするDNAをクローニングを行うことができる。ここでストリンジェントな条件とは、例えば65°C 4 x SSCにおけるハイブリダイゼーション、次いで65°Cで1時間0.1 x SSC中での洗浄である。また別法としてストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド中42°C 4 x SSCである。また、PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液中65°C 2.5時間ハイブリダイゼーション、次いで1).2xSSC, 0.05% SDS溶液: 25°C 5分、2).2xSSC, 0.05% SDS溶液: 25°C 15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50°C 20分の洗浄といった条件も許される。

本発明の実施例では、サザンブロット解析により、*C. albicans*には配列番号1に記載するDNAとハイブリダイズする遺伝子が1つだけ存在することが明らかとなっており、更に該遺伝子をクローニングしたことが示されている。上記方法により、配列番号1あるいは配列番号3とハイブリダイズするDNAを取得することが可能である。

(3).ホモロジー検索を基に、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得る方法

本発明により、*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *S. pombe*, *A. fumigatus*及び*C. neoformans*のGWT1ホモログが明らかとなっている。これら遺伝子の間で保存されている領域は、GWT1遺伝子産物が機能を発揮するために重要であると考えられ、これ以外の真菌においても保存されている可能性が高い。

そこで、保存されている領域のアミノ酸配列を基に、プローブを作製してハイブリダイズを行う、あるいはプライマーを設定してPCRを行うことにより、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得ることができる。PCRのプライマーは、保存されている領域をコードするように設定されれば、如何なる配列も許されるが、好ましくは配列番号29及び31あるいは配列番号29及び30が望ましい。

- 2 4 -

また別法としては、データベースに登録された遺伝子断片から、GWT1とホモロジーを示す塩基配列を探し出し、その塩基配列を基にプライマーを設定して、cDNAより、あるいはゲノムDNAよりPCRを行うことにより、真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質をコードするDNAを得ることができる。

得られた配列を基に、全長遺伝子を得るPCRの方法としては、3' RACE・5' RACE・inverse PCR等の手法が挙げられ、またハイブリダイズにより隣接した配列を含むクローンを選択することも可能である。これらの手法を組み合わせることにより、全長遺伝子を得ることができる。

(4). 前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する蛋白質を過剰発現、あるいは欠失した真菌を得る方法

本発明に記載の、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する蛋白質を過剰発現した真菌、好ましくは *S. cerevisiae* は、該蛋白質を発現する発現ベクター、例えば真菌で強制発現が可能なプロモーター、好ましくは出芽酵母エノラーゼ遺伝子 (EN01) のプロモーターの下流に、配列番号 1 に記載のDNAをつないだ発現ベクターを、真菌染色体上のある特定の位置に挿入する方法により得られる。

挿入する方法は、例えば pRS304 (Sikorski RS et al, Genetics. 122(1): 19-27, 1989) のマルチクローニングサイトに挿入したい配列を挿入し、インテグレーション用ベクターを作製して、真菌に導入することにより行うことができる。詳しい方法は METHODS IN ENZYMOLOGY Vol. 194: 281-301 (1991) を参照できる。

また *C. albicans* の過剰発現株は、*C. albicans* 用発現ベクター、例えば pCARS1、pRM1 等 (Pla J et al, Yeast 12: 1677-1702, 1996) に配列番号 3 あるいは配列番号 5 に記載の遺伝子を組み込んで *C. albicans* に形質転換する (Sanglard D et al, Antimicrobiol. Agents Chemother.

- 2 5 -

40: 2300-2305, 1996) ことにより得られる。

本発明に記載の、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を獲得する遺伝子を欠失した真菌、好ましくは *S. cerevisiae* は、以下の方法により得ることができるが、この例示によって本発明は限定されない。

マーカー遺伝子、好ましくは *S. pombe* の *his5* 遺伝子を鋳型とし、両端に 30 bp 以上好ましくは 40 bp 以上の欠失したい遺伝子、*S. cerevisiae* の場合配列番号 1 に記載の遺伝子の配列を含んだ PCR 産物が得られるように設計したプライマーを用い PCR 増幅を行う。PCR 産物を精製し、真菌に導入後、マーカー遺伝子に対応した選択、*his5* であれば *his⁻* の培地で培養して、欠失株を得ることができる。

また、*C. albicans* の欠失株は、配列番号 3 あるいは配列番号 5 に記載の塩基配列情報を基に、*hisG*-*URA3*-*hisG* カセットを用いた常法 (Fonzi WA et al, Genetics 134: 717-728, 1993) により得られる。

2. 被検試料が GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を及ぼすか否かを検定する方法

被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、あるいは GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かは、(1). レポータ酵素を用いる方法、(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法、(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法、(4). 真菌を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察する方法により検定できる。

以下に説明する (1)~(4) の方法により、好ましくは (1)~(4) の方法を組み合わせて用いることにより、被検試料が GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する、あるいは GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害すると判断され、しかも本件発明に記載の DNA がコードする蛋白質を、真菌に過剰発現させることにより、その阻害の程度が減弱する、

- 2 6 -

あるいは阻害が見られなくなる場合に、被検試料は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

以下、(1)～(4)の方法を説明する。

(1). レポータ酵素を用いる方法

GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程は、例えばGPIアンカー蛋白質を放射性同位元素で標識し、真菌細胞壁画分を分画後、GPIアンカー蛋白質に対する抗体による免疫沈降を行うといったトレーサー実験により定量することが可能である。また、より容易には、GPIアンカー蛋白質に共通して見られ、輸送のシグナルとして働いていると考えられるC末端配列を、測定しやすい酵素との融合蛋白質（レポータ酵素）として発現させ、真菌細胞壁画分を分画後、各画分の酵素活性を測定するレポータ系により定量することが可能である（Van Berkel MAA et al, FEBS Letters, 349: 135-138, 1994）。以下にレポータ酵素を用いた方法について説明するが、これは本発明を限定するものではない。

まず、レポータ遺伝子を構築し真菌に導入する。レポータ遺伝子は、真菌で働くプロモータ配列に続き、それぞれシグナル配列・レポータ酵素・GPIアンカー蛋白質C末端配列をコードするDNAを、reading frameを合わせてつなぎ合わせて構築する。プロモータ配列としては、例えばGAL10、EN01のプロモータの配列等が挙げられる。シグナル配列としては、例えば α -ファクター、インベルターゼ、リゾチームのシグナル配列等が挙げられる。レポータ酵素としては、例えば β ラクタマーゼ・リゾチーム・アルカリホスファターゼ・ β ガラクトシダーゼ等が挙げられる。酵素活性は持たないが容易に検出が可能なGreen Fluorescence Protein (GFP)を用いても良い。GPIアンカー蛋白質C末端配列としては、例えば α -agglutinin C末端配列・CWP2 C末端配列等が挙げられる。また、構築したレポータ遺伝子を含むベクター中に、適当な選択マーカ、例えばLE

- 27 -

U2、URA3等を挿入しておくことが好ましい。

構築したレポータ遺伝子を適当な方法、例えば酢酸リチウム法 (Gietz D et al, Nucl. Acids Res. 20: 1425, 1992) により真菌に導入し、必要であれば選択マーカーに適した方法、LEU2であればLeu⁻の培地、URA3であればUra⁻の培地で培養し、DNAが導入された真菌を選択する。

被検試料がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えるか否かは、以下の方法により検定する。

レポータ遺伝子を導入した真菌を、被検試料の存在下、適当な条件、例えば30℃で48時間培養する。培養後、培養上清を遠心分離し、培養上清画分のレポータ酵素の活性を測定する。残された菌体画分は、洗浄後、適当な方法例えばグルカナーゼで細胞壁グルカンを分解することにより、細胞壁成分を分離し、細胞壁画分及び細胞質画分のレポータ酵素の活性を測定する。なおアッセイを簡便に行うため、遠心分離後、菌体の洗浄は行わずに、菌体画分中に残る培養上清画分由来のレポータ酵素量を比例計算により求め、菌体画分のレポータ酵素量から差し引いて菌体画分中のレポータ酵素量とすることも許される。

被検試料に、一細胞当たりの培養上清画分中のレポータ酵素活性を上昇させる、あるいは一細胞当たりの細胞壁画分中のレポータ酵素活性を低下させる活性が認められれば、該被検試料はGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法

被検試料がGPIアンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁中のGPIアンカー蛋白質を、該蛋白質と反応する抗体によって定量することにより検出が可能である。

抗体としては、例えばGPIアンカー蛋白質例えば α -agglutinin・Cwp2p・Als1p等のアミノ酸配列より抗原決定基を予想して (Chen MH et al,

- 28 -

J. Biol. Chem., 270:26168-26177, 1995, Van Der Vaat JM et al, J. Bacteriol., 177:3104-3110, 1995, Hoyer LL et al, Mol. Microbiol., 15:39-54, 1995)、その領域のペプチドを合成し、抗原性のある物質例えば異種蛋白質等に結合させて、家兎等に免疫してポリクローナル抗体を、マウス等に免疫してモノクローナル抗体を得ることが可能である。また、好ましくは、Als1pペプチドに対する家兎ポリクローナル抗体が望ましい。

また別法として真菌、好ましくはGPIアンカー蛋白質例えば α -agglutinin・Cwp2p・Als1p等を過剰発現させた真菌を、場合によっては更に部分精製したGPIアンカー蛋白質を、マウス等に免疫し、融合後得られたクローンを、その産生する抗体をELISA・Western blot解析等で選択することにより、GPIアンカー蛋白質に対するモノクローナル抗体を得ることが可能である。

被検試料がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与え、細胞壁中のGPIアンカー由来蛋白質の量を減少させるか否かは、以下の方法により検定できる。

真菌を、被検試料の存在下、適当な条件、例えば30℃、48時間培養する。培養した真菌を遠心により集菌し、菌体を好ましくはガラスビーズを用いて破碎する。洗浄した破碎菌体を、好ましくはSDSで抽出遠心後、沈殿を洗浄する。抽出後の破碎菌体を、グルカンを分解する酵素、好ましくはグルカナーゼで処理し、その遠心上清をGPIアンカー蛋白質サンプルとする。

抗Als1pペプチド抗体を、96 wellプレートに4℃、overnightでコーティングする。洗浄液好ましくは0.05% Tween 20含有PBS(PBST)で洗浄後、96 wellプレートの非特異的吸着部位をブロックする試薬、好ましくはBSA・ゼラチン等の蛋白質、更に好ましくはブロックエースでブロッキング

- 29 -

グする。再度洗浄液好ましくはPBSTで洗浄後、場合によっては適当に希釈したGPIアンカー蛋白質サンプルを加え、適当な時間例えば室温で2時間反応させる。洗浄液好ましくはPBSTで洗浄後、酵素標識した*C. albicans*に対する抗体、好ましくはHRP標識抗カンジダ抗体を、適当な時間例えば室温で2時間反応させる。標識の方法は酵素標識であっても、放射性同位元素による標識であっても許される。洗浄液好ましくはPBSTで洗浄後、標識に適した方法、酵素標識であれば基質溶液を加え、反応停止後490 nmの吸光度を測定することにより、GPIアンカー蛋白質サンプル中のAls1p量を算出する。

(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法

被検試料がGPIアンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁中のGPIアンカー蛋白質の活性、好ましくは真菌の動物細胞への付着能等を測定することにより、検定が可能である。GPIアンカー蛋白質の活性としては、動物細胞への付着に関与するAls1p、Hwp1等の他に、matingに関与する α -agglutinin、酵母の凝集に関与するFlo1p等が知られている。以下に、真菌の動物細胞への付着能により検定する方法について具体的に記載するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

真菌としては、細胞に対する付着能を有する真菌を使用し、好ましくは真菌は*C. albicans*であることが望ましい。哺乳類細胞としては真菌が接着する性質を有する細胞を使用し、好ましくは細胞は腸管上皮細胞であることが望ましい。哺乳類細胞を培養し、適当な方法例えばエタノール固定により固定する。そこへ被検試料と適当な時間、例えば30°Cで48時間インキュベートした真菌を接種し、一定時間例えば30°Cで1時間培養後、培養上清を除去しバッファーで洗浄して寒天培地、例えばサブロー・デキストロース寒天培地 (Difco) を重層する。30°C一晚培養後、コ

- 30 -

コロニー数をカウントし、付着率を計算する。

被検試料に、化合物処理を行わなかった真菌と比較して、細胞に付着することにより形成されたコロニー数を低下させる活性が認められれば、該被検試料はGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

(4). 真菌を電子顕微鏡あるいは光学顕微鏡で観察する方法

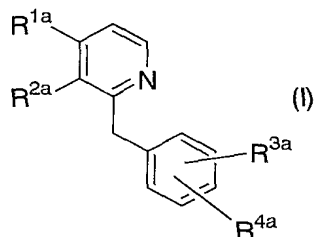
被検試料がGPIアンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁の構造を電子顕微鏡により観察することにより検定が可能である。

被検試料の存在下で、真菌例えば*C. albicans*を、一定時間例えば30℃で48時間培養し、透過型電子顕微鏡を用いて超微形態学的構造を観察する。ここで、透過型電子顕微鏡による観察は、例えば電子顕微鏡チャートマニュアル（医学出版センター）に記載の方法により行うことができる。透過型電子顕微鏡像で見られる、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造は、GPIアンカー蛋白質を構成成分とする表層糖蛋白質層であると考えられ、既存の他の抗真菌剤では影響を受けない。無処置菌体と比較し、この電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、僅かな高電子密度の層を残して消失している場合は、該被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

また透過型電子顕微鏡に併せ、光学顕微鏡下による観察で、真菌細胞が大きく膨化し出芽（分裂）が阻害されている像が観察される場合、該被検試料が細胞壁に対して影響を与えていると判断される。

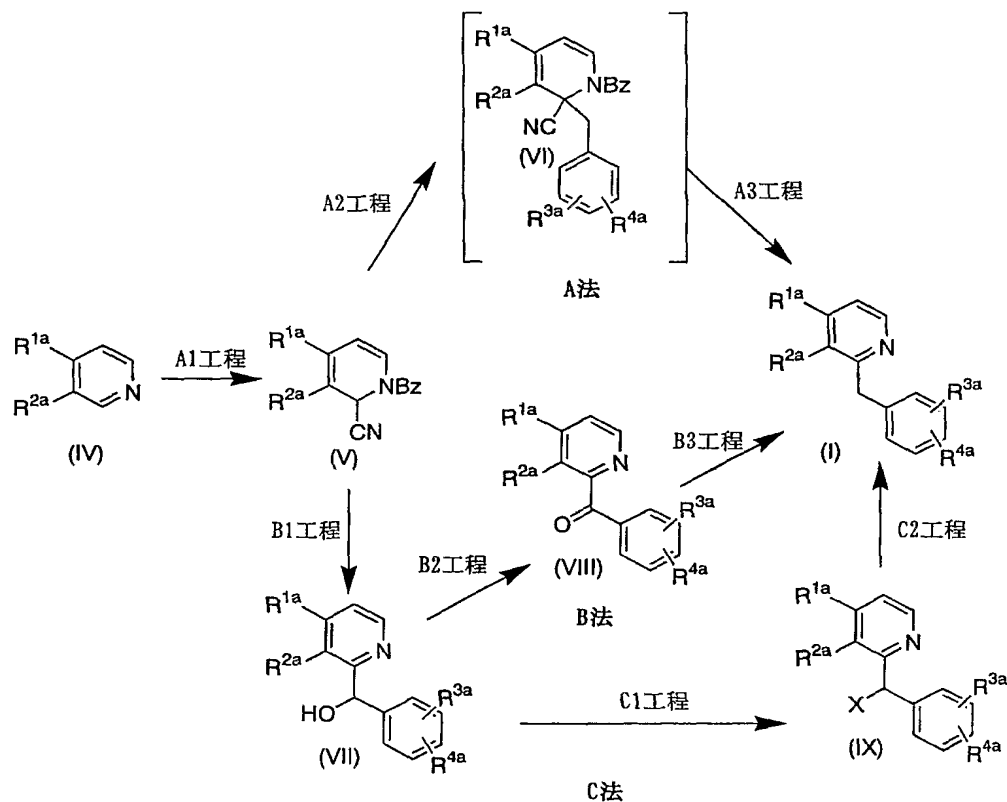
式(I)

- 3 1 -



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。) で表わされる本発明化合物は、これまでに知られている通常の有機化学反応などを利用して合成することができるが、例えば以下の方法で合成することができる。

一般製造方法 (1)



(式中、Xはハロゲン基、アシル基などの脱離基を表す。R^{3c}は、R^{3a}と同意義を示す。式中のその他の記号は前記定義と同意義を意味する。)

A1工程 ライスルト(Reissert) 化合物 (V) を製造する反応である。Org. Synth., VI, 115(1988)、Heterocycles, 36(11), 2489(1993)、J. Chem. Soc. (C), 666(1969)、またはJ. Heterocycl. Chem., 29(5),

- 3 2 -

1165(1992)などの文献に記載の反応条件に基づいて製造することができる。用いる試薬としては具体的には、例えばベンゾイルクロリドとシアニ化カリウムの組み合わせの条件等があげられる。

A2工程 アルキル化の工程である。化合物(V)と置換基を有するベンジルハライド誘導体や置換基を有するベンジルメタンスルフォナート誘導体などと塩基存在下反応させることにより化合物(VI)を製造することができる。塩基としては具体的には、例えば水素化ナトリウム、水酸化ナトリウムなどを挙げることができる。

A3工程 加水分解反応の工程である。化合物(VI)を塩基存在下、加水分解することにより化合物(I)を製造することができる。

A法とは、A1工程、A2工程そしてA3工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

B1工程 化合物(V)から化合物(VII)への工程である。化合物(V)と置換基を有するベンズアルデヒドを塩基と相間移動触媒の存在下、反応させることにより化合物(VII)を製造することができる。例えば、塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが挙げられる。相間移動触媒としては、トリエチルベンジルアンモニウムクロリドなどが挙げられる。

B2工程 アルコールからケトンへの酸化の工程である。アルコールからケトンへの酸化反応で一般に用いられる酸化剤、条件を用いることによりケトン体(VIII)を製造することができる。酸化剤としては具体的には、例えば二酸化マンガン、二酸化クロムまたはベンゾキノンなどが挙げられる。

B3工程 ケトンからメチレンへの還元工程である。ケトン体(VIII)からメチレン体(I)への還元反応で一般に用いられる還元剤の条件を用いることによりメチレン体(I)を製造することができる。例えば、還元剤

- 3 3 -

としては、ヒドラジン水和物と水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウム、トリエチルシランとボロントリフルオライドあるいはトリフルオロメタンスルホン酸などが挙げられる。

B法とは、A1工程、B1工程、B2工程そしてB3工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

C1工程 水酸基のハロゲン化あるいはアシル化の工程である。化合物(VII)をハロゲン化剤あるいはアシル化剤を用いて化合物(IX)を製造することができる。ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、濃塩酸、三臭化リンなどがあげられる。また、アシル化剤としては、例えばアセチルクロリドなどの酸ハライド、無水酢酸などの酸無水物などが挙げられる。

C2工程 ハロゲン基あるいはアシル基の還元的脱離反応の工程である。化合物(IX)を触媒などを用いて水素化脱離することにより化合物(I)を製造することができる。

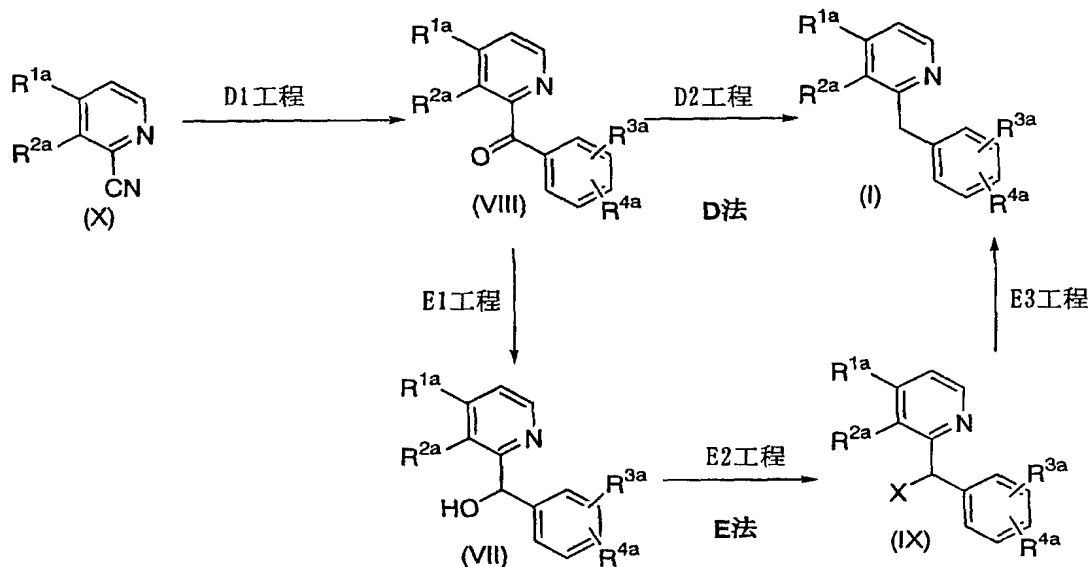
例えば、触媒としては、パラジウム-炭素などが挙げられる。

C法とは、A1工程、B1工程、C1工程そしてC2工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (2)

一般式(I)で表わされる本発明化合物は、以下の方法でも合成することができる。

- 3 4 -



(式中、Xはハロゲン基、アシル基などの脱離基を表す。式中のその他の記号は前記定義と同意義を意味する。)

D1工程 グリニャール反応とそれに続く酸加水分解反応の工程である。化合物(X)と置換基を有していてもよいフェニルグリニャール試薬を反応させ、続いて酸存在下加水分解することにより化合物(VIII)を製造することができる。

D2工程 B3工程と同様な条件により、ケトン体(VIII)からメチレン体(I)を製造することができる。

D法とは、D1工程とD2工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

E1工程 ケトンからアルコールへの還元反応の工程である。ケトンからアルコールへの還元反応で一般に用いられる還元剤、条件を用いて化合物(VIII)から化合物(VII)を製造することができる。用いる還元剤としては具体的には、例えば水素化ホウ素ナトリウム、水素化アルミニウムリチウムなどが挙げられる。

E2工程 C1工程と同様な条件により、アルコール体(VII)からハロゲン化あるいはアシル化体(IX)を製造することができる。

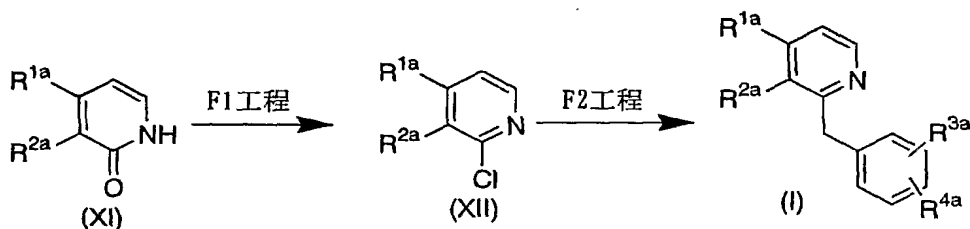
- 3 5 -

E3工程 C2工程と同様な還元的脱離反応の条件で、化合物(IX)から化合物(I)を製造することができる。

E法とは、D1工程、E1工程、E2工程そしてE3工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (3)

一般式(I)で表わされる本発明化合物は、以下の方法でも合成することができる。



F法

(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

F1工程 塩素化反応の工程である。化合物(XI)を塩素化剤を用いることにより化合物(XII)を製造することができる。塩素化剤としては、例えばオキシ塩化リン、塩化チオニルなどが挙げられる。

F2工程 グリニャール試薬とのカップリング反応の工程である。Arch. Pharm, 314, 156(1981)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物(XII)に置換基を有していても良いベンジルグリニャール試薬を触媒存在下反応させることにより化合物(I)を製造することができる。触媒としては、例えば、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロニッケル(II)などが挙げられる。

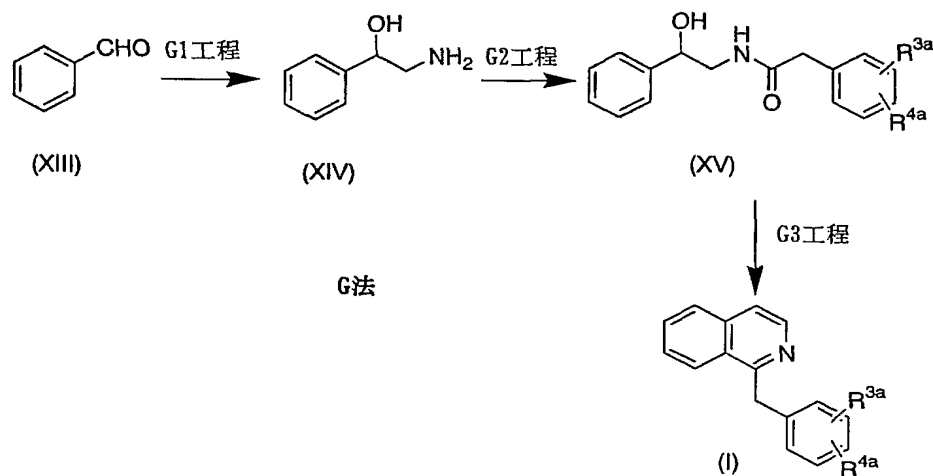
F法とは、F1工程とF2工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (4)

本発明化合物、一般式(I)のうち、R^{1a}とR^{2a}が一緒になってベンゼン環、

- 36 -

ピリジン環、ピロール環、チオフェン環、フラン環、シクロヘキサン環、またはシクロペンタン環などの縮合環を形成する場合、以下の方法で合成することができる。



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

製造方法の例としてイソキノリン環を形成する場合の製造方法を示す。

G1工程 縮合反応とそれに続く還元反応の工程である。置換基を有していてもよいベンズアルデヒド誘導体(XIII)とニトロメタンとの縮合反応後、ニトロ基の還元を行うことにより化合物(XIV)を製造することができる。例えば、ニトロ基の還元を用いられる試薬としては、パラジウム-炭素とギ酸アンモニウム、水素化アルミニウムリチウムなどの組み合わせが挙げられる。

G2工程 アミド結合形成反応である。化合物(XIV)と置換基を有していても良いフェニル酢酸クロリドをアミド結合生成反応に用いるカップリング試薬を用いることにより化合物(XV)を製造することができる。例えば、*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミドと*N*-ヒドロキシスクシンイミド、*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミドと*N*-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1,1'-カルボニルジイミダゾールなどが挙げられる。

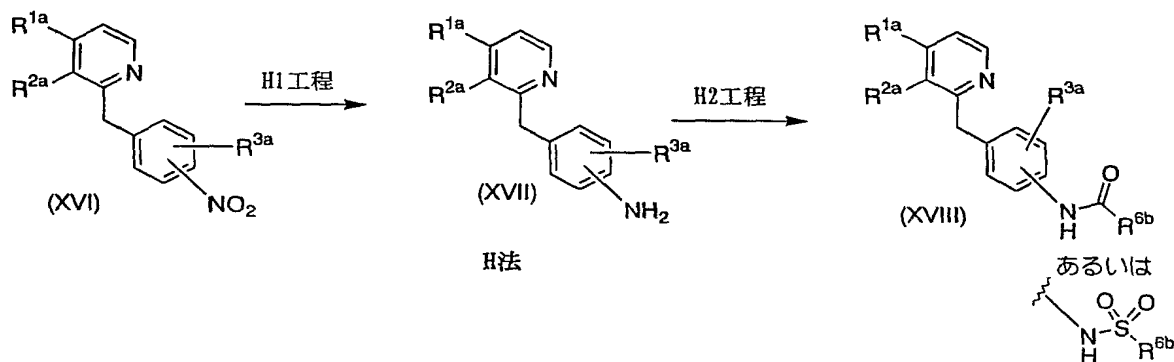
- 3 7 -

G3工程 環化反応の工程である。化合物(XV)をOrganic Reaction, 6, 74(1951)、J. Hetetocyclic Chem., 30, 1581(1993)などの文献に記載の反応条件に基づいて、製造することができる。例えば、試薬としてはオキシ塩化リン、ポリリン酸などが挙げられる。

G法とは、G1工程、G2工程そしてG3工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (5-1)

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)の R^{3a} 、 R^{4a} の置換基変換
(5-1) アミノ基、アミド基、スルホンアミド基等への置換基の変換



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

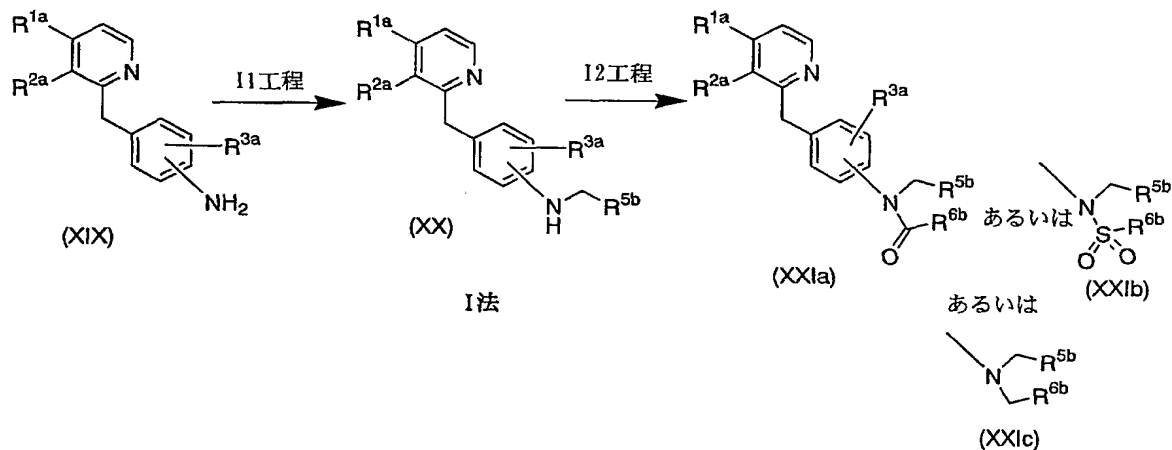
H1工程 ニトロ基の還元反応である。化合物(XVI)を一般的に利用されるニトロ基の還元法で還元することにより化合物(XVII)を製造することができる。例えば、ニトロ基の還元法としては、パラジウム-炭素、水酸化パラジウムによる接触水素化還元、鉄-塩化アンモニウム、鉄-塩酸、鉄-酢酸などによる還元が挙げられる。

H2工程 アシル化あるいはスルフォニル化反応の工程である。化合物(XVII)を酸クロリドあるいは酸無水物を用いることにより化合物(XVIII)を製造することができる。

H法とは、H1工程とH2工程を経由して化合物(XVIII)を製造する方法で

- 38 -

ある。



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

I1工程 還元的アミノ化反応の工程である。化合物(XIX)と置換基を有していても良いアルデヒドをJ. Am. Chem. Soc., 93, 2897(1971)、Comprehensive Organic Synthese, 8, 25(1991)、Tetrahedron, 40, 1783(1984)そしてTetrahedron, 41, 5307(1985)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物(XX)を製造することができる。例えば、還元的アミノ化試薬としては、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアン水素化ホウ素ナトリウム、ボラン-ピリジン錯体、パラジウム-炭素/水素等が挙げられる。

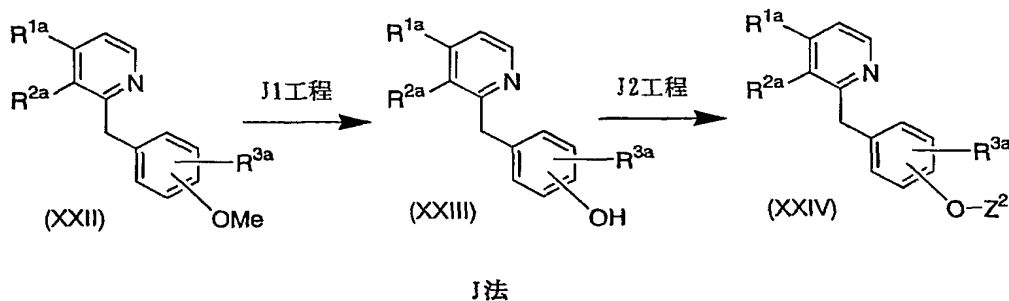
I2工程 アシル化、スルフォニル化あるいは還元的アミノ化反応の工程である。化合物(XX)を酸クロリドあるいは酸無水物を用いることにより化合物(XXIa)あるいは化合物(XXIb)を製造することができる。または、還元的アミノ化反応をI1工程と同様に行うことにより化合物(XXIc)を製造することができる。

I法とは、I1工程とI2工程を経由することにより化合物(XXIa)、化合物(XXIb)あるいは化合物(XXIc)を製造する方法である。

一般製造方法 (5-2)

- 3 9 -

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)の R^{3a} 、 R^{4a} の置換基変換
 (5-2) 水酸基、アルコキシ基等への置換基の変換



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

J1工程 脱メチル化反応で、Bull. Chem. Soc. Jpn., 44, 1986(1971)、Org. Synth., Collect. Vol. V, 412(1073)、J. Am. Chem. Soc., 78, 1380(1956)、またはJ. Org. Chem., 42, 2761(1977)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物(XXII)から化合物(XXIII)を製造することができる。例えば、脱メチル化反応に使用される試薬としては、47%臭化水素酸水溶液、ボロントリブロミド、ピリジン塩酸塩そしてヨードトリメチルシランなどが挙げられる。

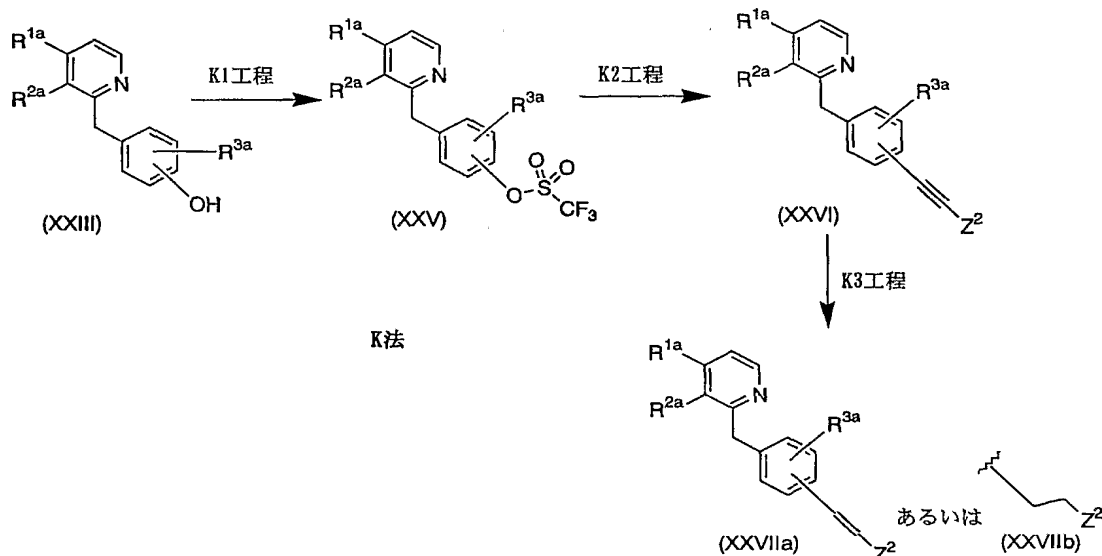
J2工程 アルキル化反応の工程である。化合物(XXIII)を塩基存在下置換基されていても良いアルキルハライドあるいは置換基されていてもよいアルキルメタンサルフォネートなどと反応させることにより化合物(XXIV)を製造することができる。

J法とは、J1工程とJ2工程を経由して化合物(XXIV)を製造する方法である。

一般製造方法 (5-3)

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)の R^{3a} 、 R^{4a} の置換基変換
 (5-3) ビニレン基またはエチニレン基、アルキル基等への置換基の変換

- 40 -



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

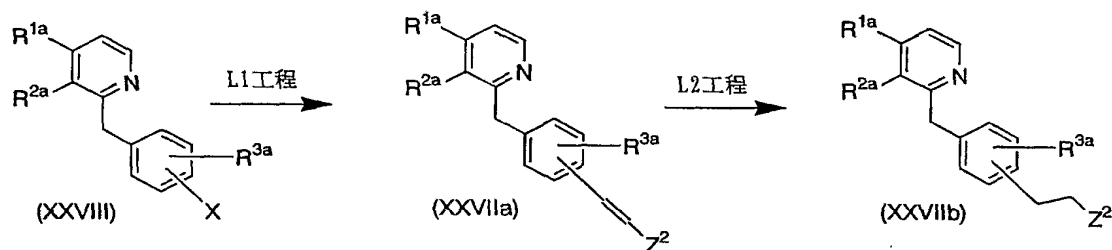
K1工程 トリフラート化反応の工程である。化合物(XXIII)を塩基存在下トリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させることにより化合物(XXV)を製造することができる。

K2工程 アルキンとのカップリング反応の工程である。化合物(XXV)とアルキン誘導体をパラジウムのホスフィン錯体、ヨウ化銅そして塩基存在下、カップリングすることにより化合物(XXVI)を製造することができる。例えば、パラジウムのホスフィン錯体を系中で生成させる試薬としては、パラジウム-炭素とトリフェニルホスフィン、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)とトリフェニルホスフィン、ジクロロビストリフェニルホスフィンパラジウム(II)、酢酸パラジウム(II)とトリ(o-トリル)ホスフィン、酢酸パラジウム(II)と1,1'-ビス(ジフェニルフォスフィノ)フェロセンなどが挙げられる。塩基としては、トリエチルアミン、ピペリジン、ピリジン、炭酸カリウムなどが挙げられる。反応により塩化リチウムを使用することがある。

K3工程 不飽和炭化水素の還元反応の工程である。化合物(XXVI)を触

- 4 1 -

媒を用いた接触水素化還元などにより化合物(XXVIIa)あるいは化合物(XXVIIb)を製造する方法である。例えば、触媒として用いられるものとしてはパラジウム-炭素、水酸化パラジウム、酸化白金、パラジウム-炭素-炭酸カルシウムなどが挙げられる。



Xはハロゲン原子、トリフルオロスルホネートなどの脱離基を表す。

L法

(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

L1工程 アルケンとのカップリング反応（ヘック（Heck）反応）の工程である。J. Org. Chem., 37, 2320(1972)、Org. Reactions., 27, 345(1982)、Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, 833(1991)、Palladium Reagents and Catalysts, 125(1995)、Chem. Commun., 1287(1984)、Tetrahedron Lett, 26, 2667(1985)そしてTetrahedron Lett, 31, 2463(1990)などの文献に記載の反応条件に基づいて、触媒（パラジウム錯体と配位子など）を用いて、化合物(XXVIII)から化合物(XXVIIa)を製造することができる。この反応に用いる触媒（パラジウム錯体と配位子）の組み合わせとしては、例えば酢酸パラジウム(II)と1,1'-ビス(ジフェニルフォスフィノ)フェロセン、酢酸パラジウム(II)とトリ(ortho-トリル)フォスフィンなどが挙げられる。用いられる3級塩基としてはトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンそして1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセンなどが挙げられる。化合物(XXVIII)のXは脱離基を意味し、例えばハロゲン基、トリフルオロメタンスルフォニルオキシ

- 4 2 -

基などを挙げることができる。

L2工程 K3工程と同様な不飽和炭化水素の還元反応の条件により、化合物(XXVIIa)から化合物(XXVIIb)を製造することができる。

L法とは、L1工程により化合物(XXVIIa)、続いてL2工程により化合物(XVIIb)を製造する方法である。

本発明にかかる前記式(I)で表わされる化合物について得られる種々の異性体は、通常分離手段(例えば再結晶、クロマトグラフィー等)を用いることにより精製し、単離することができる。

本発明にかかる化合物もしくはその塩またはそれらの水和物は、それ自体を哺乳動物(好ましくはヒト)に投与することもできるが、慣用されている方法により錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、被覆錠剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、眼軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤、ローション剤等として製剤化して投与することもできる。製剤化には通常用いられる製剤化助剤(例えば賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤や、および必要により安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調製剤、防腐剤、抗酸化剤など)を使用することができ、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して常法により製剤化される。例えば経口製剤を製造するには、本発明にかかる化合物またはその薬理学的に許容される塩と賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。これらの成分としては例えば、大豆油、牛脂、合成グリセライド等の動植物油；流動パラフィン、スクワラン、固形パラフィン等の炭化水素；ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル等のエステル油；セトステアリルアルコール、ベヘニルアルコール等の高級アルコール；シリコン樹脂；シリコン油；ポリ

- 4 3 -

オキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー等の界面活性剤；ヒドロキシエチルセルロース、ポリアクリル酸、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロースなどの水溶性高分子；エタノール、イソプロパノールなどの低級アルコール；グリセリン、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ソルビトールなどの多価アルコール；グルコース、ショ糖などの糖；無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、マグネシウム、ケイ酸アルミニウムなどの無機粉体、精製水などがあげられる。賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素などが、結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシエチレン・ブロックポリマー、メグルミンなどが、崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が、滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が、着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末等が用いられる。これらの錠剤・顆粒剤には糖衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。また、シロップ剤や注射用製剤等の液剤を製造する際に

- 4 4 -

は、本発明にかかる化合物またはその薬理学的に許容される塩にpH調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤などを加えて、常法により製剤化する。外用剤を製造する方法は限定されず、常法により製造することができる。すなわち製剤化にあたり使用する基剤原料としては、医薬品、医薬部外品、化粧品等に通常使用される各種原料を用いることが可能である。使用する基剤原料として具体的には、例えば動植物油、鉱物油、エステル油、ワックス類、高級アルコール類、脂肪酸類、シリコン油、界面活性剤、リン脂質類、アルコール類、多価アルコール類、水溶性高分子類、粘土鉱物類、精製水などの原料が挙げられ、さらに必要に応じ、pH調整剤、抗酸化剤、キレート剤、防腐防黴剤、着色料、香料などを添加することができるが、本発明にかかる外用剤の基剤原料はこれらに限定されない。また必要に応じて分化誘導作用を有する成分、血流促進剤、殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、アミノ酸、保湿剤、角質溶解剤等の成分を配合することもできる。なお上記基剤原料の添加量は、通常外用剤の製造にあたり設定される濃度になる量である。

本発明にかかる化合物もしくはその塩またはそれらの水和物を投与する場合、その形態は特に限定されず、通常用いられる方法により経口投与でも非経口投与でもよい。例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、眼軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤、ローション剤などの剤として製剤化し、投与することができる。本発明にかかる医薬の投与量は、症状の程度、年齢、性別、体重、投与形態・塩の種類、疾患の具体的な種類等に応じて適宜選ぶことができる。

本発明にかかる抗真菌剤は、患者に対して治効量投与される。ここで「治効量」とは、意図される薬理学的結果を生じさせ、処置されるべき

- 4 5 -

患者の症状を回復または軽減するために有効な薬剤の量である。投与量は、患者の体重、疾患の種類、症状の程度、患者の年齢、性差、薬剤に対する感受性差などにより著しく異なるが、通常成人として1日あたり、約0.03-1000 mg、好ましくは0.1-500 mg、さらに好ましくは0.1-100 mgを1日1-数回、または数日に1-数回に分けて投与する。注射剤の場合は、通常約1 μ g/kg-3000 μ g/kgであり、好ましくは約3 μ g/kg-1000 μ g/kgである。

図面の簡単な説明

図1は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程の模式図。GPIアンカー蛋白質は、一旦GPI (Glycosylphosphatidylinositol) にアンカーした後、細胞壁に輸送される。

図2は、*S. cerevisiae*レポータ系での前記式(I a)に記載の化合物の活性を示すグラフ。前記式(I a)に記載の化合物の存在下では、0.39~1.56 μ g/mlの濃度で培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇、細胞壁画分中の活性が低下し、3.13 μ g/ml以上の濃度で増殖抑制が見られた。

図3は、*C. albicans*の動物細胞付着への前記式(I a)に記載の化合物の影響を示すグラフ。増殖抑制の見られない1.56 μ g/mlの濃度でも、*C. albicans*の動物細胞への付着が半分程度にまで抑制された。

図4は、*C. albicans*のAls1p抗原量への前記式(I a)に記載の化合物の影響を示すグラフ。前記式(I a)に記載の化合物の存在下では、0.1~0.39 μ g/mlの濃度で、培養上清画分中のAls1p抗原量が上昇し、細胞壁画分中の抗原量が低下した。

図5は、*C. albicans*遺伝子のGWT1遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析を示す写真。EcoRIで6.5 kb、HindIIIで4.0 kb、EcoRI-Hind

- 46 -

IIIで2.0 kb、EcoRI-PstIで2.5 kbの単一のバンドが観察され、*C. albicans*の前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性遺伝子のホモログは、単一の遺伝子として存在することが予想された。

図6は、GWT1遺伝子産物を過剰発現した*S. cerevisiae*における前記式(I a)に記載の化合物の活性を示すグラフ。*S. cerevisiae* CW63株(図中の「W/T」)では、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下している前記式(I a)に記載の化合物濃度(0.39~1.56 $\mu\text{g/ml}$)でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1株では影響が見られず、また*S. cerevisiae* CW63株では増殖が抑制される前記式(I a)に記載の化合物濃度(> 3.13 $\mu\text{g/ml}$)でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1株(図中の「O/E」)では増殖抑制が見られなかった。

図7は、*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*のGWT1遺伝子のコードする蛋白において高度に保存されている領域を整列させた図。

発明を実施するための最良の形態

[実施例A]

以下の実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

実施例A1 レポータ遺伝子の構築と*S. cerevisiae*への導入

(1). リゾチームをレポータ酵素とするレポータ遺伝子の構築

EN01プロモーター＋分泌シグナル＋リゾチーム遺伝子を含むプラスミドpESH (Ichikawa K et al, Biosci. Biotech. Biochem., 57(10), 1686-1690, 1993) を鋳型に、配列番号8及び配列番号9に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、プロモータ配列を含むリゾチーム遺伝子をPCRにより増幅し、pCR-Script SK(+)のSalI-EcoRI siteにサブクローニングした(a)。また、*S. cerevisiae*染色体DNAを鋳型に、配列番

- 47 -

号10及び配列番号11に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてCWP2遺伝子をPCR増幅し、pUC19のEcoRI-HindIII siteにサブクローニングした(b)。同様に、pYES2 (INVITROGEN) を鋳型に、配列番号12及び配列番号13に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてしてCYC1ターミネーターをPCR増幅し、pUC19の新たに導入したNotI-KpnI siteサブクローニングした(c)。

次に、pESHのSalI-HindIII切断部分にSalI-EcoRIで切り出したリゾチーム遺伝子(a)およびEcoRI-HindIIIで切り出したCWP2遺伝子(b)を挿入した。最後に、EN01プロモーター＋分泌シグナル＋リゾチーム遺伝子＋CWP2遺伝子を含む遺伝子をBamHI-HindIIIで切り出し、インテグレーション用ベクターpRS306 (Sikorski RS et al, Genetics. 122(1):19-27, 1989) に挿入後、HindIII-KpnI切断部分にHindIII-KpnIで切り出したCYC1ターミネーター(c)を挿入し、pRLW63Tを作製した。

(2).セファロスポリナーゼをレポータ酵素とするレポータ遺伝子の構築

上述のpESHを鋳型にして、EN01プロモーターC末＋分泌シグナル部分(d)を鋳型にし、配列番号14及び配列番号15に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、プロモータ配列・分泌シグナル部分を含むDNAをPCRにより増幅し、pUC19の新たに導入したBamHI-NotI siteにサブクローニングした(d)。また、*Citrobacter freundii*染色体DNAを鋳型にし、配列番号16及び配列番号17に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、セファロスポリナーゼ遺伝子をPCR増幅し、pUC19の新たに導入したNspV-XbaI siteにサブクローニングした(e)。同様に*S. cerevisiae*染色体DNAを鋳型にし、配列番号18及び配列番号19に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、CWP2遺伝子PCR増幅し、pUC19のXbaI-HindIII siteにサブクローニングした(f)。

(d)を挿入したプラスミドのBamHI-SalI切断部分にpESHのBamHI-SalI

- 48 -

断片を挿入し、EN01プロモーター全長＋分泌シグナル部分を作製後、NspV-HindIII切断部分にNspV-XbaIで切り出したセファロスポリナーゼ遺伝子およびXbaI-HindIIIで切り出したCWP2遺伝子を挿入した。次いで、EcoRI-HindIIIで切り出し、上述のpRS306に挿入後、HindIII-KpnI切断部分にCYC1ターミネーターを挿入して、pRCW63Tを作製した。

(3). レポータ遺伝子の *S. cerevisiae* への導入

S. cerevisiae G2-10株を、10 mlのYPD培地にて30℃で振とう培養し、対数増殖後期($2 \sim 5 \times 10^7$ cells/ml)の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKER™ Yeast Transformation System(Clontech)を用いた酢酸リチウム法 (YEASTMAKER™ Yeast Transformation System User Manualに記載) によって上述したpRLW63TおよびpRCW63Tを導入した。pRLW63TはEcoRVで、pRCW63TはApaIでURA3遺伝子を切断したものを用いた。SD(Ura⁻)培地で30℃、3日間培養後、増殖したコロニーをYPD培地で培養した。

リゾチームおよびセファロスポリナーゼ活性の局在を確認したところ、両活性共に主として細胞壁に局在し、CWP2のC端配列が細胞壁への輸送シグナルとして働いていることが確認された。

実施例 A 2 *S. cerevisiae* レポータ系による薬剤のスクリーニング

リゾチームと比較して、セファロスポリナーゼの方が酵素反応の感度が良いことから、化合物のスクリーニングには、pRCW63Tを導入した *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* CW63株) を用いた。

YPD 液体培地に 30℃、48 時間静置培養後、YPD 液体培地で 100 倍希釈した菌液 ($3 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml) 75 μ l/well を、被検試料希釈液 25 μ l/well が入った V 底 96 well プレートに接種し、30℃で 48 時間静置培養した。プレートを遠心後、上清 25 μ l を 96 well 平底プレートにサンプリングし、培養上清画分とした。

沈殿した菌を懸濁し、2.4M ソルビトールで調整したザイモリエース

- 49 -

(生化学工業) 溶液 $75\mu\text{l}/\text{well}$ を加え、 30°C 、1時間作用させた。プレートを遠心後、上清 $10\mu\text{l}$ を 96 well 平底プレートにサンプリングし、 $15\mu\text{l}$ のリン酸バッファーを加え、細胞壁画分とした。

プールしたサンプルに $200\mu\text{M}$ ニトロセフィン溶液を加え、一定時間後にクエン酸バッファーで反応停止後、 490 nm の吸光度を測定することにより、培地および細胞壁画分中のセファロスポリナーゼ活性を測定した。

また、被検試料存在下での菌の増殖は、肉眼による観察で判定した。

図 2 には、前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、 $0.39\sim 1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下することを示した。この様に、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性を上昇させ、かつ細胞壁画分中のセファロスポリナーゼ活性を減少させる化合物を、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物とした。

実施例 A 3 カンジダの動物細胞への付着を指標とした薬剤のスクリーニング

6穴マルチウェルプレートの各穴に、10%牛胎児血清および 2 mM グルタミンを含む D-MEM 培地 (日水製薬) で 1×10^5 個/ ml に調整した IEC-18 細胞を、 3 ml ずつ分注した。該プレートを炭酸ガスインキュベータ内で 37°C 、3日間培養後、培養上清を除去し、エタノール固定した。

各濃度の被検試料を含有したサブロー・デキストロース液体培地で 30°C ・48時間培養した *C. albicans* を 4×10^2 個/ ml に調整し、固定した IEC-18 細胞を培養したプレートの各穴に、 1 ml 接種した。 30°C ・1時間培養後、培養上清を除去し、PBSで洗浄後、サブロー・デキストロース寒天培地 (Difco) を 2 ml 重層した。 30°C 、一夜培養後、増殖してきたコロニー数 (CFU) をカウントし、付着率を算出した。

図 3 には前記式 (I a) に記載の化合物で、増殖抑制の見られない 1.

- 50 -

56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも、*C. albicans*の動物細胞への付着が半分程度にまで抑制されたことを示した。処理しない*C. albicans*と比較して、細胞に付着したCFUを減少させた被検試料を、*C. albicans*の動物細胞への付着を抑制する化合物とした。

実施例 A 4 ELISA による GPI アンカー蛋白質の定量値を指標とした薬剤のスクリーニング

(1).抗 Als1p ペプチド抗体の作製

配列番号 20 に記載の合成ペプチドを KLH とコンジュゲートし、家兎に免疫した。得られた抗血清をアフィニティ精製し、IgG 画分を抗 Als1p ペプチド抗体とした。

(2).抗 Als1p ペプチド抗体を用いた ELISA による薬剤のスクリーニング

C. albicans を、各濃度の被検薬剤を含有したサブロー・デキストロース液体培地中 (5 ml) で 30°C・48 時間培養し、遠心による集菌、洗浄後、300 μl のトリス塩酸バッファーに懸濁した。懸濁した菌体を、ガラスビーズを入れたマイクロチューブに移し、1 分間の攪拌、1 分間の氷冷を 10 回繰り返すことにより破碎した。洗浄した破碎菌体を 2% SDS で 95°C・10 分間抽出し、遠心後、沈殿をリン酸バッファーで 5 回洗浄した。その沈殿に 5 $\mu\text{g/ml}$ のザイモリエース溶液 0.5 ml を加え 37°C・1 時間反応後、その遠心上清を GPI アンカー蛋白質サンプルとした。

50 μl の抗 Als1p ペプチド抗体 (40 $\mu\text{g/ml}$) を、96 well プレートに 4°C・overnight コーティングした。0.05% Tween 20 含有 PBS (PBST) で 5 回洗浄後、25% ブロックエースで室温、2 時間ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後、2 倍階段希釈した GPI アンカー蛋白質サンプル 50 μl を室温、2 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、1000 倍希釈した HRP 標識抗カンジダ抗体 (ViroStat) 100 μl を室温、2 時間反応させ、PBST で 5 回洗浄後、基質溶液 75 μl を加えた。反応停止後、490 nm の吸光度を測定した。

- 5 1 -

図 4 には、前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、0.1~0.39 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、培養上清画分中のAls1p抗原量が上昇し、細胞壁画分中の抗原量が低下していることを示した。この様に、化合物で処理しない*C. albicans*と比較して、ELISAで定量した培養上清画分中のAls1p量を上昇させ、あるいは胞壁画分中のAls1p量を減少させた化合物を、*C. albicans*のGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物とした。

実施例 A 5 被検試料の存在下で培養した*C. albicans*細胞壁の電子顕微鏡による観察

各濃度の被検薬剤を含有したサブロー・デキストロース液体培地中 (5 ml) で 30°C・48 時間培養後、遠心、集菌した *C. albicans* を過マンガン酸カリ固定法により固定し、透過型電子顕微鏡像を観察した。

菌体最外層に電子密度の高い綿状線維構造が観察され、GPIアンカー蛋白質を構成成分とする表層糖蛋白質層であると考えられた。この綿状線維構造は既存の他の抗真菌剤では影響を受けなかった。

前記式 (I a) に記載の化合物の存在下で培養した *C. albicans* は、無処置菌体と比較し、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、僅かな高電子密度の層を残して消失していた。この様に、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が消失している場合に、被検試料を GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与える化合物とした。

実施例 A 6 *S. cerevisiae* の前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子のスクリーニング

S. cerevisiae 遺伝子のプラスミドライブラリーは、ATCC (Information for ATCC Number: 37323) から入手した。

S. cerevisiae G2-10 株を、10 ml の YPD 培地にて 30°C で振とう培養し、対数増殖後期 ($1 \sim 2 \times 10^7$ cells/ml) の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKERTM Yeast Transformation System (Clontech) を用いた酢酸リ

- 5 2 -

チウム法 (YEASTMAKER™ Yeast Transformation System User Manualに記載) によって、*S. cerevisiae* 遺伝子のプラスミドライブラリーを導入し、SD (Leu-) プレート上に撒いて、約80000個のコロニーを得た。コロニーを回収・希釈し、前記式 (I a) に記載の化合物を $1.56 \mu\text{g/ml}$ 及び $3.125 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含むSD (Leu-) プレートに、プレート当たり57万コロニーになるように撒いた。その後、37°Cで72時間インキュベートして耐性クローンを獲得した。

27個のクローンをピックアップし、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 194: 169-182 (1991)に記載の方法によりプラスミドを回収して、インサートを解析したところ、27個全てが同一のフラグメントを含んでいた。

ABI377 system (PE applied Biosystems社製) を用いて塩基配列を決定した結果、配列番号1に記載のDNAが、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を付与するDNAであることが明らかとなりGWT1と命名した。

実施例 A 7 *S. cerevisiae* GWT1遺伝子の、*C. albicans* ホモログのサザンブロット解析

25 μg の *C. albicans* ゲノムDNAを、EcoRI (TaKaRa)、HindIII (TaKaRa)、BamHI (TOYOBO)、PstI (New England Biolabs) (2種類の酵素の組み合わせも含む) で16時間処理後、エタノール沈殿により濃縮し、25 μl の滅菌水に溶解してサンプルとした。制限酵素消化した25 μg の genome DNAを、0.75%アガロースゲル電気泳動法により分離し、ナイロンメンブレン (GeneScreen PLUS /NEN) へトランスファーした。

プローブは、配列番号1に記載の約1.5 kbのDNAフラグメント20 ngを、ランダムプライマー法により alpha33P-dCTPでラベルし、GeneQuantカラム (Amersham-Pharmacia) を用いて精製し作製した。

ハイブリダイゼーションは、メンブレンを、10 mlのPerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液に浸し65°Cで1時間プレインキュベーションをおこなった後、

- 5 3 -

ラベルした上記プローブを添加し、65℃で更に2.5時間インキュベーションした。洗浄は、1).2xSSC, 0.05% SDS溶液:25℃5分、2).2xSSC, 0.05% SDS溶液:25℃15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50℃20分で行った。洗浄後のメンブレンをサランラップで包み、Imaging Plate (FUJI) と室温で12時間接触させ、Imaging Plateに転写されたイメージをBAS2000 (FUJI) を用いて取り込み、画像解析をおこなった。

その結果、EcoRIで6.5 kb、HindIIIで4.0 kb、EcoRI-HindIIIで2.0 kb、EcoRI-PstIで2.5 kbの単一のバンドが観察され (図5)、*C. albicans*の前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子のホモログは、単一の遺伝子として存在することが予想された。

実施例 A 8 *C. albicans*の前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子のスクリーニング

*C. albicans*のゲノムライブラリーは、Navaro-Garcia F et al, Mol. Cell. Biol., 15: 2197-2206, 1995に記載の方法により作製した。具体的には、*C. albicans*のゲノムDNAをSau3AIで部分消化した後、3~5 kb前後のDNAフラグメントを回収し、YEp352シャトルベクターのBamHIサイトに挿入した。

S. cerevisiae G2-10株を、10 mlのYPD培地にて30℃で振とう培養し、対数増殖後期($2 \sim 5 \times 10^7$ cells/ml)の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKER™ Yeast Transformation System(Clontech)を用いた酢酸リチウム法 (YEASTMAKER™ Yeast Transformation System User Manualに記載) によって、*C. albicans*のゲノムライブラリーを導入し、SD (Ura⁻) プレート上に撒いて、約25000個のコロニーを得た。コロニーを回収・希釈し、前記式 (I a) に記載の化合物を $1.56 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含むSDプレートに、プレート当たり50万コロニーになるように撒いた。その後、30℃で6時間、37℃へ移して66時間インキュベートして耐性クロ

- 5 4 -

ーンを獲得した。

30個のクローンをピックアップし、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 194: 169-182 (1991)に記載の方法によりプラスミドを回収して、インサートを解析したところ、30個のうち28個が同一のフラグメントを含んでいた。

ABI377 system (PE applied Biosystems社製)を用いて、塩基配列を決定した結果、配列番号3に記載のDNAが、前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性を付与するDNAであることが明らかとなった。

実施例 A 9 C. albicans臨床分離株からの前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性遺伝子ホモログのクローニング

発明者らが保存するC. albicans臨床分離株より精製した、ゲノムDNAを鋳型とし、配列番号21及び配列番号22をプライマーとしてPCRによる増幅を行った。独立した3本のPCRサンプルから、いずれも約1.6 kbのDNAフラグメントが増幅され、増幅されたフラグメントを精製し、pT7-Blueベクター (Novagen) にサブクローニングして塩基配列を決定したところ、配列番号5に示すDNA配列が見いだされた。実施例 A 7に記載のDNA (配列番号3) との間で3箇所の配列が異なっていた。

また、Stanford大のsequenceセンター(<http://sequence-www.stanford.edu/>)で決定されたC. albicans遺伝子塩基配列中にも、実施例 A 7に記載のDNAのホモログが見出され (配列番号7)、実施例 A 7に記載のDNA (配列番号3) との間で4箇所の配列が異なっていた。

実施例 A 10 GWT1遺伝子産物を過剰発現したS. cerevisiaeの作製

実施例 A 6で得られた前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性クローンより精製したプラスミドを鋳型とし、配列番号23及び配列番号24をプライマーとして、PCR増幅を行った。PvuIIで切断したPCR産物を、実施例 A 1で作製したpRLW63TのSalI-HindIII切断部分に挿入した。

- 5 5 -

BamHI-KpnI でインサート全体を切り出し、pRS304 (Sikorski RS et al, Genetics. 122(1): 19-27, 1989) の MCS に挿入し、インテグレーション用ベクターを作製した。

セファロスポリナーゼ遺伝子をレポータ遺伝子として持つ、*S. cerevisiae* CW63 株を実施例 A1 に記載の方法で培養し、インテグレーション用ベクターの TRP1 を EcoRV で切断後、実施例 A1 に記載の方法で形質転換した。SD(Trp⁻)培地で 30°C、3 日間培養することにより GWT1 過剰発現株を得た (*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株)。

GWT1 過剰発現株は、前記式 (I a) に記載の化合物に対して耐性を示す以外に、野生株との差異は見られず、他の抗真菌剤シクロヘキシミド、ベノミル、アンホテリシン B に対して感受性であった。

実施例 A 1 1 GWT1 遺伝子を欠失した *S. cerevisiae* の作製

S. pombe の his5 遺伝子 (Longtine MS et al, Yeast, 14: 953-961, 1998) を鋳型とし、配列番号 25 及び配列番号 26 をプライマーとして、両端に GWT1 配列を含む his5 カセットを PCR で増幅した。

S. cerevisiae G2-10 を実施例 A1 に記載の方法で培養、集菌し、上述の PCR 産物を実施例 A1 に記載の方法で形質転換した。SD(His⁻)培地で 30°C、5~7 日間培養することにより GWT1 欠失株を得た。

GWT1 欠失株は生育が非常に遅いものの、その生育は前記式 (I a) に記載の化合物の影響を受けず、GWT1 遺伝子産物が該化合物の標的であることが示唆された。また、GWT1 欠失株は、高温で生育できない、細胞が膨化しているといった特徴を示し、透過型電子顕微鏡による観察では、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、消失していた。

実施例 A 1 2 GWT1 遺伝子産物を過剰発現した *S. cerevisiae* における前記式 (I a) に記載の化合物の活性

S. cerevisiae CW63 株及び GWT1 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* CW6

- 5 6 -

3/GWT1を用い、実施例 A 2 に記載した方法に準じた方法で、前記式 (I a) に記載の化合物の活性を検討した。

その結果、*S. cerevisiae* CW63 株では、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下している前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株では影響が見られず、また *S. cerevisiae* CW63 株では増殖が抑制される前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($> 3.13 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株では増殖抑制が見られなかった (図 6)。

実施例 A 1 3 (4-ブチルフェニル)(1-イソキノリル)ケトンの合成

窒素雰囲気下、マグネシウム 338 mg (13.9 ミリモル) とテトラヒドロフラン 6.5 ml の混合溶液に、1-ブロモ-4-ブチルベンゼン 2.29 ml (13.0 ミリモル) と開始剤として触媒量の 1, 2-ジブロモエタンを加え、10 分間還流下撹拌した。この溶液を 0 °C まで冷却し、1-イソキノリンカルボニトリル 1.0 g (6.49 ミリモル) のテトラヒドロフラン溶液を加え、さらに室温で 1 時間、70 °C で 3 時間撹拌した。その後、再度 0 °C に冷却し、濃塩酸 2.56 ml そしてメタノール 11 ml を加えた後、2 時間加熱還流した。濃縮後残渣を 5 規定水酸化ナトリウムとトルエンに溶解し、セライトで濾過した。濾液のトルエン層を分配し、水洗、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 1.72 g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.93 (3H, t), 1.32-1.43 (2H, m), 1.58-1.66 (2H, m), 2.68 (2H, t), 7.28 (2H, d), 7.61 (1H, td), 7.74 (1H, td), 7.80 (1H, d), 7.87 (2H, d), 7.92 (1H, d), 8.20 (1H, d), 8.60 (1H, d)

実施例 A 1 4 前記式 (I a) に記載の化合物 {1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン} の合成

- 5 7 -

実施例 A 1 3 の化合物 1.72 g (5.95 ミリモル)、ヒドラジン 1 水和物 836 mg (16.7 ミリモル) そして水酸化カリウム 769 mg (13.7 ミリモル) をジエチレングリコール 8.5 ml に加え、80°C で 1 時間、160°C で 3 時間半そして 200°C で 1 時間攪拌した。室温まで冷却後、氷水を加え酢酸エチルで抽出した。これを水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、前記式 (I a) に記載の化合物を 914mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.50-1.59(2H, m), 2.53(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.53(1H, td), 7.56(1H, d), 7.64(1H, td), 7.81(1H, d), 8.18(1H, d), 8.50(1H, d)

実施例 A 1 5 前記式 (I a) に記載の化合物 {1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン} の製造方法の別法

60% 水素化ナトリウム 16 mg (0.40 ミリモル) のジメチルホルムアミド (1.8 ml) 溶液に窒素雰囲気下 -16°C で、Org. Synth., VI, 115 (1988) の文献に基づいて合成した 1-シアノ-2-ベンゾイル-1,2-ジヒドロイソキノリン 100 mg (0.38 ミリモル) と 4-n-ブチルベンジルクロリド 70 mg (0.38 ミリモル) のジメチルホルムアミド (3.6 ml) 溶液を滴下し、さらに室温で 30 分間攪拌した。水を加え、濃縮し、残渣にトルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カリウムで乾燥後、濃縮した。残渣のエタノール (1.6 ml) 溶液に 50% 水酸化ナトリウム水溶液 (0.63 ml) を加え、2 時間加熱還流した。濃縮後、トルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カルシウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、前記式 (I a) に記載の化合物 18 mg を得た。

実施例 A 1 6 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*C. albicans* ホモログの

- 5 8 -

クローニング

HindIII (TaKaRa) で16時間処理した25 μ gの*C. albicans*ゲノムDNAを、0.75%アガロースゲル電気泳動法により分離し、約3.5から4.5 kbの大きさのDNAフラグメントをゲルから回収した。回収したDNAフラグメントをpKF3ベクター (TaKaRa) のHindIIIサイトに挿入して、カンジダゲノムライブラリを作製した。

作製したライブラリを用いて約1万個のコロニーをLB/Ampicillinプレートにdisplayした後、Colony/Plaque Screen (NEN) メンブレンを用いてコロニーリフトを行いハイブリダイゼーションに供した。プローブは、配列番号1に記載の約1.5 kbのDNAフラグメント20 ngを、ランダムプライマー法によりalpha33P-dCTPでラベルし、GeneQuantカラム (Amersham-Pharmacia) を用いて精製し作製した。

ハイブリダイゼーションは、メンブレンをPerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液に浸し65℃で1時間プレインキュベーションをおこなった後、ラベルした上記プローブを添加し、65℃で更に2.5時間インキュベーションした。洗浄は、1).2xSSC, 0.05% SDS溶液: 25℃5分、2).2xSSC, 0.05% SDS溶液: 25℃15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50℃20分で行った。洗浄後のメンブレンをサランラップで包み、X-RAY FILM (KONICA) に室温で24時間接触させた後現像した。感光したスポットに相当する大腸菌コロニーを分離して、2次スクリーニングに供した。分離したコロニーをLB/Ampicillinプレートに約200個ずつdisplayし、1次スクリーニング同様にコロニーリフトをおこないハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーションの条件は1次スクリーニングと同一の条件でおこなった。

その結果、プローブと強く反応する大腸菌の単一なコロニーが分離された。このコロニーからプラスミドを回収し、含有する配列を決定したところ、実施例A9で見出された配列 (配列番号5) と同一の新規配列

- 59 -

が見いだされ（カンジダGWT1の配列）、*C. albicans*ホモログであることが予想された。

実施例 A 1 7 *S. cerevisiae* GWT1遺伝子の、*S. Pombe*ホモログ

データベース検索により、*S. cerevisiae* GWT1遺伝子とホモロジーを示す*S. Pombe*遺伝子（配列番号 2 7、及びその遺伝子産物のアミノ酸配列：配列番号 2 8）が見出され、GWT1の*S. Pombe*ホモログであると考えられた。

実施例 A 1 8 *S. cerevisiae* GWT1遺伝子の、*Aspergillus fumigatus* ホモログのクローニング

発明者らは遺伝子配列解析により、*S.cerevisiae*, *S.pombe*, *C.albicans*のGWT1遺伝子のコードする蛋白において高度に保存されている領域を2カ所見いだした（図7）。この保存領域のアミノ酸をコードするDNAの予測から、配列番号 2 9、配列番号 3 0 及び配列番号 3 1 のプライマーを設計した。STRATAGENE社から購入したライブラリ（*Aspergillus fumigatus* cDNA library:#937053）1 μ lを鋳型に用いて、配列番号 2 9 および配列番号 3 1 のプライマーを用いてPCR増幅をおこなった。さらにこの増幅サンプル1 μ lを鋳型に、配列番号 2 9 および配列番号 3 0 のプライマーでnested-PCRをおこなった結果、約250 bpの単一フラグメントの増幅が確認された。このフラグメントの配列を決定したところ配列番号 3 2 に示す、*S.cerevisiae*のGWT1遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られ、これが*A.fumigatus*のホモログであることが予想された。

全長のcDNAを獲得するために、増幅フラグメントの配列をもとに配列番号 3 3 および配列番号 3 4 のプライマーを設計した。また、ライブラリの遺伝子挿入部位の外側のプライマー配列番号 3 5 および配列番号 3 6 を設計した。*A.fumigatus* cDNAライブラリを鋳型にして、配列番号 3 3 および配列番号 3 5 のプライマーセット、または配列番号 3 4 および

- 60 -

配列番号 36 のプライマーセットを用いて PCR をおこなった結果、両者から約 1 kb の DNA フラグメントの増幅が確認された。これらのフラグメントの塩基配列を決定した結果、配列番号 1 に示す *S. cerevisiae* の GWT1 遺伝子と高い相同性を有する新規の配列が得られた。同配列は *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* の GWT1 遺伝子と全体を通じて高い相同性を有することから、この配列が *A. fumigatus* のホモログであることが強く示唆された。

A. fumigatus のホモログ全体をクローニングするために、得られた配列をもとに、開始コドン上流に相当する配列番号 37 に示すプライマーおよび終止コドン下流に相当するプライマー配列番号 38 を新たに設計した。*A. fumigatus* cDNA ライブラリ (STRATAGENE 社) および *A. fumigatus* ゲノムライブラリ (STRATAGENE 社) を鋳型に、配列番号 37 および配列番号 38 のプライマーで 35 サイクルの PCR をおこなった結果、両方の鋳型から約 1.6 kb の単一の増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した結果、cDNA ライブラリからは配列番号 39 に示す塩基配列が見いだされ、配列番号 40 に示す 501 アミノ酸からなる蛋白をコードしていることが示唆された。また、ゲノムライブラリからは配列番号 41 に示す塩基配列が見いだされ、77 塩基対からなるイントロンを 1 カ所所有していることが判った。

実施例 A19 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*Cryptococcus* ホモログのクローニング

1). データベースサーチ

データベースサーチによって *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子と相同性のある遺伝子を検索した結果、スタンフォード大学のゲノムセンターのサーバー (<http://baggage.stanford.edu/cgi-misc/cneoformans/>) から、

- 6 1 -

502042C05.x1の配列を見いだした。また、米国オクラホマ大学のサーバー (http://www.genome.ou.edu/cneo_blast.html) から、b6e06cn.f1の配列を見いだした。

2).ゲノムDNAを鋳型としたPCR

502042C05.x1の配列をもとに配列番号42のプライマーを作製し、またb6e06cn.f1の配列をもとに配列番号43のプライマーを作製した。クリプトコッカス (*Cryptococcus neoformans*) のゲノムDNAを鋳型にして、配列番号42のプライマーおよび配列番号43のプライマーを用いてPCR増幅を行ったところ、約2 kbの増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列を決定したところ、配列番号44に示す、*S. cerevisiae*のGWT1遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られた。

クリプトコッカスGWT1遺伝子の開始コドン上流の配列を獲得するために、502042C05.x1の配列をもとに配列番号45のプライマーを設計し、また配列番号44の配列をもとに配列番号46のプライマーを設計した。クリプトコッカスのゲノムDNAを鋳型にして、配列番号45のプライマーおよび配列番号46のプライマーを用いてPCR増幅を行ったところ、約500 bpの増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列を決定したところ、配列番号47に示す配列が得られ、配列番号44とオーバーラップすることが判った。

3).3'-RACE

クリプトコッカスGWT1遺伝子の3'末端の配列を得るために、3'-RACEをおこなった。クリプトコッカスから抽出した16 μ gのtotal RNAをもとに配列番号48で示すadaptor-primerでプライミングし、SuperScript II Reverse Transcriptase (GIBCO/BRL社製) を用いて逆転写反応をおこない、以降のRT-PCRの鋳型となる1本鎖cDNAを作製した。1本鎖cDNAを鋳型に、配列番号49および配列番号50に示すプライマーで35サイ

- 6 2 -

クルのPCRをおこなった結果、約1.2 kbの増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列をDirect-Sequence法によって解析したところ、配列番号51に示す、*S.cerevisiae*のGWT1遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られた。

4). 全長ゲノムDNAのPCR

配列番号47をもとに設計した配列番号52のプライマーおよび、配列番号51をもとに設計した配列番号53のプライマーを用いて、クリプトコッカスのゲノムDNAを鋳型に独立した3本のpreparationで35サイクルのPCRをおこなった。その結果、独立した3本のtubeからはいずれも約2 kbの増幅フラグメントが検出されたので、それぞれ個別にDirect-Sequenceに供し、全塩基配列を決定した。その結果、3つの独立した配列は完全に一致し、配列番号54に示すクリプトコッカスのGWT1遺伝子ホモログ全長を含む配列が得られた。

5). cDNA配列の決定

配列番号54に示すゲノム由来のクリプトコッカスGWT1遺伝子配列を、3'-RACEによって得られたcDNA配列51と比較することにより、2カ所のイントロンの存在が示唆された。また、開始ATG以降のOpen Reading Frame が通っていないことから、さらにもう1カ所のイントロンの存在が示唆された。そこで、予想されるアミノ酸配列およびスプライシング・ドナー/アクセプター配列から、cDNA構造を予測し、エクソン間のジャンクションと予想される部位に、配列番号55および配列番号56で示すプライマーを設計した。クリプトコッカス由来の一本鎖cDNAをテンプレートに上記プライマーを用いて35サイクルのPCRをおこなった結果、約1.4 kbの増幅フラグメントが確認された。同フラグメントをDirect-Sequenceに供し塩基配列の決定をおこなった結果、配列番号57に示す配列が得られ、配列番号54と照合することにより、クリプトコッカスのGWT1

- 6 3 -

遺伝子のcDNA配列が配列番号58に示す構造であることが示唆された。同配列は*S.cerevisiae*, *S.pombe*, *C.albicans*, *A.fumigatus*のGWT1遺伝子と部分的に高い相同性を有することから、この配列がクリプトコッカスのホモログであることが強く示唆された。

実施例A20 前記式(Ia)で表される化合物に対し耐性を付与する遺伝子変異

pRLW63Tを導入することによりリゾチーム遺伝子をレポータ遺伝子として持つ、*S. cerevisiae* LW63株をメタンスルホン酸エチルで処理した後、前記式(Ia)で表される化合物を1.56, 3.13, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含むSD培地で37°C、3日間培養することにより耐性変異株を5株得た(R1~R5)。この内、R1変異株およびR5変異株は、一遺伝子変異により前記式(Ia)で表される化合物に対する特異的な耐性形質を獲得していることがわかった。この2つの突然変異株がGWT1遺伝子上に変異を持っているかどうかを確かめるために、両変異株からゲノムDNAを抽出し、GWT1遺伝子部分について塩基配列決定を行った。この結果、R1変異株では1213番目のグアニンがアデニンに変異していた。またR5変異株では418番目のグアニンからアデニンに変異していた。これによりR1変異株では405番目のアミノ酸であるイソロイシンがバリンに、またR5変異株では140番目のアミノ酸であるグリシンがアルギニンに変わっていることが判明した。

次にこれらの変異が前記式(Ia)で表される化合物に対する特異的な耐性形質獲得の原因となっているかを確かめるために、両変異株由来ゲノムDNAを鋳型として配列番号60及び61に記載のプライマーを用いて変異GWT1遺伝子(R1またはR5)を単離した。同時にGWT1のプロモータ領域(配列番号62)、およびターミネーター領域(配列番号63)を単離し、GWT1遺伝子プロモータ、変異GWT1遺伝子ORF、およびGWT1遺伝

- 6 4 -

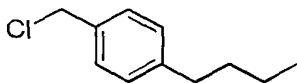
子ターミネーターをpRS316ベクターに挿入して、変異GWT1遺伝子を1コピー発現するプラスミドを構築した(pRS316GWT1-R1, pRS316GWT1-R5)。これをGWT1遺伝子が1コピーのみ破壊されている2倍体株(WDG1)に導入した。このコロニーを孢子形成培地上で培養することにより孢子を形成させ、四分子分析を行うことにより、上記プラスミドを持ち、かつ染色体上のGWT1遺伝子が破壊されているクローンを得た。これを前記式(I a)で表される化合物を含む培地で培養したところ、もとのR1変異株、R5変異株と同様に、前記式(I a)で表される化合物に対して耐性を示した。以上のことから、GWT1遺伝子上に起こったアミノ酸変異を伴う点突然変異により前記式(I a)で表される化合物に対する特異的な耐性形質が付与されることが明らかとなり、この化合物がGWT1タンパク質に直接結合してその機能を阻害していることが強く示唆された。

[実施例B]

本発明にかかる化合物は、例えば以下の実施例に記載した方法により製造することができる。ただし、これらは例示的なものであって、本発明にかかる化合物は如何なる場合も以下の具体例に制限されるものではない。

実施例B 1

1-(クロロメチル)-4-n-ブチルベンゼン



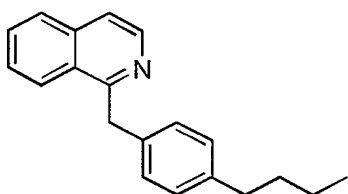
4-n-ブチルベンジルアルコール2.0g (12ミリモル)のエーテル(25ml)溶液に、塩化チオニル2.5ml (34ミリモル)を加え、室温で3時間攪拌した。濃縮後、ベンゼンによる共沸により過剰の塩化チオニルを除去し、表題化合物2.3gを得た。この化合物は精製することなく次の反応に用い

- 6 5 -

た。

実施例 B 2

1-(4-ブチルベンジル) イソキノリン



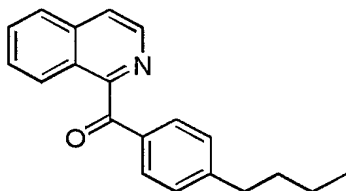
60%水素化ナトリウム16mg (0.40ミリモル) のジメチルホルムアミド (1.8ml) 溶液に窒素雰囲気下 -16°C で、Org. Synth., VI, 115(1988)の文献に基づいて合成した1-シアノ-2-ベンゾイル-1,2-ジヒドロイソキノリン100mg (0.38ミリモル) と4-n-ブチルベンジルクロリド70mg (0.38ミリモル) のジメチルホルムアミド (3.6ml) 溶液を滴下し、さらに室温で30分間攪拌した。水を加え、減圧濃縮し、残渣にトルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣のエタノール(1.6ml)溶液に50%水酸化ナトリウム水溶液 (0.63ml) を加え、2時間加熱還流した。濃縮後、トルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カルシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物18mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.50-1.59(2H, m), 2.53(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.53(1H, td), 7.56(1H, d), 7.64(1H, td), 7.81(1H, d), 8.18(1H, d), 8.50(1H, d)

実施例 B 3

(4-ブチルフェニル) (1-イソキノリル) ケトン

- 6 6 -



窒素雰囲気下、マグネシウム 338mg (14ミリモル) とテトラヒドロフラン 6.5ml の混合溶液に、1-ブロモ-4-ブチルベンゼン 2.29ml (13ミリモル) と開始剤として触媒量の 1, 2-ジブロモエタンを加え、10 分間還流下撹拌した。この溶液を 0℃ まで冷却し、1-イソキノリンカルボニトリル 1.0g (6.5ミリモル) のテトラヒドロフラン溶液を加え、さらに室温で 1 時間、70℃ で 3 時間撹拌した。その後、再度 0℃ に冷却し、濃塩酸 2.6ml そしてメタノール 11ml を加えた後、2 時間加熱還流した。濃縮後、残渣を 5 規定水酸化ナトリウムとトルエンに溶解し、セライトで濾過した。濾液のトルエン層を分離し、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 1.7g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.93(3H, t), 1.32-1.43(2H, m), 1.58-1.66(2H, m), 2.68(2H, t), 7.28(2H, d), 7.61(1H, td), 7.74(1H, td), 7.80(1H, d), 7.87(2H, d), 7.92(1H, d), 8.20(1H, d), 8.60(1H, d)

実施例 B 4

1-(4-ブチルベンジル) イソキノリンの製造方法の別法

実施例 B 3 の化合物 1.7g (6.0ミリモル)、ヒドラジン 1 水和物 836mg (17ミリモル) そして水酸化カリウム 769mg (14ミリモル) をジエチレングリコール 8.5ml に加え、80℃ で 1 時間、160℃ で 3 時間半そして 200℃ で 1 時間撹拌した。室温まで冷却後、氷水を加え酢酸エチルで抽出した。これを水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮

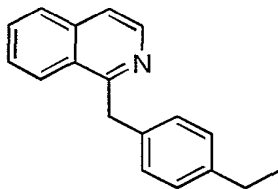
- 67 -

した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物914mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.50-1.59(2H, m), 2.53(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.53(1H, td), 7.56(1H, d), 7.64(1H, td), 7.81(1H, d), 8.18(1H, d), 8.50(1H, d)

実施例 B 5

1-(4-エチルベンジル) イソキノリン

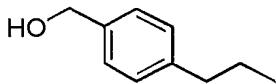


p-エチルベンジルクロリドを用いて実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.18(3H, t), 2.57(2H, q), 4.64(2H, s), 7.08(2H, d), 7.20(2H, d), 7.50-7.55(2H, m), 7.61-7.65(1H, m), 7.80(1H, d), 8.16-8.18(1H, m), 8.49(1H, d)

実施例 B 6

(4-プロピルフェニル) メタノール



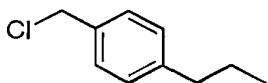
0℃まで冷却した *p*-*n*-プロピルベゾイックアシッド5.0g(32ミリモル)のテトラヒドロフラン(20ml)溶液に、水素化ホウ素ナトリウム2.9g(76ミリモル)と濃硫酸のエーテル(エーテル4.0mlに濃硫酸2.0mlを加えて調製した。)溶液を反応系内の温度が20℃以上に上昇しないように滴下し、室温で3時間攪拌した。氷冷後、メタノールと1規定水酸化ナト

- 6 8 -

リウムを加え酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物を4.33g得た。この化合物は精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 7

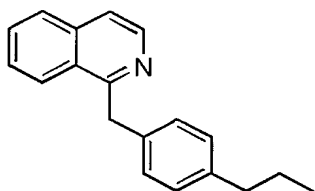
1- (クロロメチル) -4-プロピルベンゼン



実施例 B 6 の化合物を実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。この化合物はさらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 8

1- (4-プロピルベンジル) イソキノリン

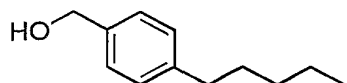


実施例 B 7 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.55-1.61(2H, m), 2.51(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.51-7.55(2H, m), 7.61-7.65(1H, m), 7.81(1H, d), 8.17(1H, dd), 8.49(1H, d)

実施例 B 9

(4-ペンチルフェニル) メタノール

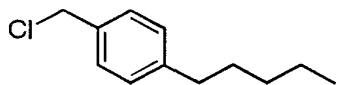


4-n-アミルベンゾイックアシッドを実施例 B 6 と同様に変換して表題化合物を得た。

実施例 B 10

- 6 9 -

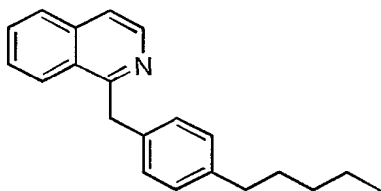
1-(クロロメチル)-4-ペンチルベンゼン



実施例 B 9 の化合物を実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。この化合物はさらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 1

1-(4-ペンチルベンジル) イソキノリン

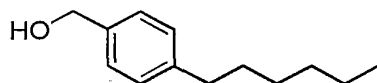


実施例 B 1 0 を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm})$: 0.86(3H, t), 1.26-1.33(4H, m), 1.52-1.59(2H, m), 2.52(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.50-7.55(2H, m), 7.61-7.65(1H, m), 7.80(1H, d), 8.17(1H, dd), 8.49(1H, d)

実施例 B 1 2

(4-ヘキシルフェニル) メタノール

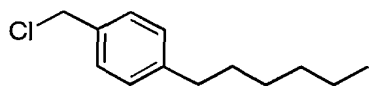


4-n-ヘキシルベンゾイックアシッドを実施例 B 6 と同様に変換して表題化合物を得た。この化合物はさらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 3

1-(クロロメチル)-4-ヘキシルベンゼン

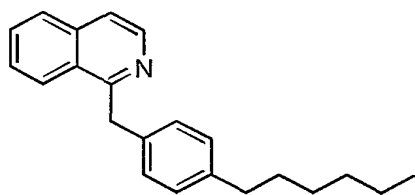
- 70 -



実施例 B 1 2 の化合物を実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。
この化合物はさらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 4

1-(4-ヘキシルベンジル) イソキノリン

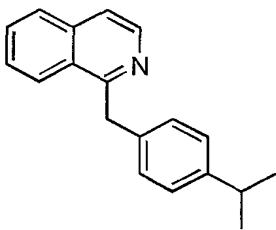


実施例 B 1 3 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.86(3H, t), 1.26-1.31(6H, m), 1.51-1.58(2H, m), 2.52(2H, t), 4.63(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.50-7.55(2H, m), 7.61-7.65(1H, m), 7.80(1H, d), 8.17(1H, dd), 8.49(1H, d)

実施例 B 1 5

1-(4-イソプロピルベンジル) イソキノリン



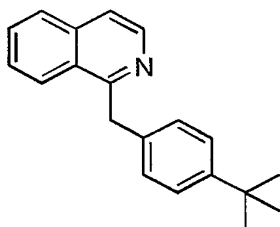
p-イソプロピルベンジルクロリドを実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.19(6H, d), 2.80-2.87(1H, m), 4.64(2H, s), 7.11(2H, d), 7.21(2H, d), 7.51-7.56(2H, m), 7.61-7.65(1H, m), 7.81(1H, d), 8.19(1H, dd), 8.50(1H, d)

- 7 1 -

実施例 B 1 6

1-[4-(tert-ブチル)ベンジル]イソキノリン

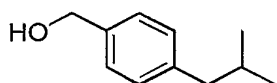


4-tert-ブチルベンジルクロリドを実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.26(9H, s), 4.64(2H, s), 7.22(2H, d), 7.27(2H, d), 7.52-7.56(2H, m), 7.62-7.66(1H, m), 7.81(1H, d), 8.19(1H, dd), 8.50(1H, d)

実施例 B 1 7

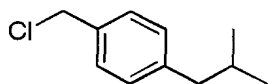
(4-イソブチルフェニル)メタノール



4-イソブチルベンゾイックアシッドを実施例 B 6 と同様に変換して表題の化合物を得た。さらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 8

1-(クロロメチル)-4-イソブチルベンゼン

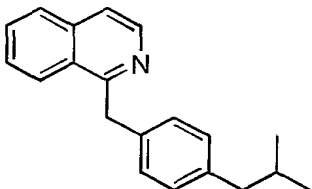


実施例 B 1 7 の化合物を実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。さらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 9

1-(4-イソブチルベンジル)イソキノリン

- 7 2 -

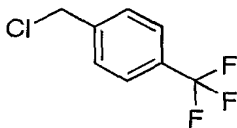


実施例 B 1 8 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.86(6H, d), 1.75-1.83(1H, m), 2.39(2H, d), 4.66(2H, s), 7.02(2H, d), 7.18(2H, d), 7.52-7.58(2H, m), 7.63-7.67(1H, m), 7.82(1H, d), 8.18(1H, d), 8.50(1H, d)

実施例 B 2 0

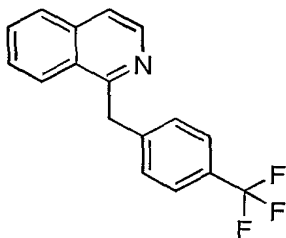
1-(クロロメチル)-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン



4-トリフルオロメチルベンジルアルコールを実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。さらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 2 1

1-[4-(トリフルオロメチル)ベンジル]イソキノリン



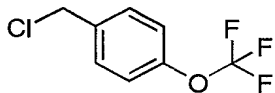
実施例 B 2 0 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 4.73(2H, s), 7.39(2H, d), 7.51(2H, d), 7.54-7.60(2H, m), 7.65-7.69(1H, m), 7.84(1H, d), 8.09-8.10(1H, m), 8.51(1H, d)

実施例 B 2 2

- 73 -

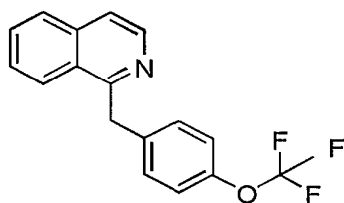
1-(クロロメチル)-4-(トリフルオロメトキシ)ベンゼン



4-トリフルオロメトキシベンジルアルコールを実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。さらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 2 3

1-[4-(トリフルオロメトキシ)ベンジル]イソキノリン

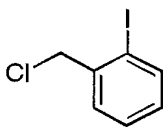


実施例 B 2 2 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.67(2H, s), 7.10(2H, d), 7.27(2H, d), 7.54-7.59(2H, m), 7.64-7.68(1H, m), 7.84(1H, d), 8.11(1H, dd), 8.50(1H, d)

実施例 B 2 4

1-(クロロメチル)-2-ヨードベンゼン

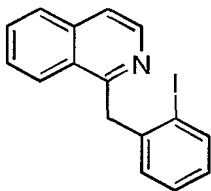


0℃に冷却したo-ヨードベンジルアルコール5.0g (21ミリモル) の塩化メチレン (50ml) 溶液に、メタンスルフォニルクロリド2.0ml (29ミリモル) とトリエチルアミン3.6ml (26ミリモル) を加え、その温度で19時間攪拌した。5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物を5.34g 得た。

- 7 4 -

実施例 B 2 5

1-(2-ヨードベンジル)イソキノリン

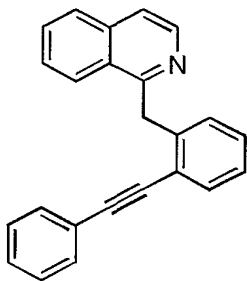


実施例 B 2 4 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.74(2H, s), 6.81-6.84(1H, m), 6.87-6.92(1H, m), 7.11-7.15(1H, m), 7.55-7.57(1H, m), 7.60(1H, d), 7.64-7.68(1H, m), 7.83-7.86(1H, m), 7.89-7.91(1H, m), 8.00-8.02(1H, m), 8.50(1H, d)

実施例 B 2 6

1-[2-(2-フェニル-1-エチニル)ベンジル]イソキノリン



窒素雰囲気下、実施例 B 2 5 の化合物 345mg (1.07ミリモル) のピロリジン (1.5ml) 溶液に、テトラキストリフェニルフォスフィンパラジウム 58mg (0.05ミリモル) とエチニルベンゼン 204mg (2.0ミリモル) のピロリジン (1.5ml) 溶液を加え、80℃で3時間攪拌した。室温まで冷却後、酢酸エチルで希釈後、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 280mg を得た。

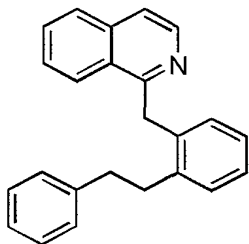
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.95(2H, s), 6.98-7.06(2H, m), 7.10-7.21

- 7 5 -

(2H, m), 7.31-7.35(3H, m), 7.48-7.51(3H, m), 7.57-7.65(2H, m),
7.82(1H, d), 8.25(1H, d), 8.52(1H, d)

実施例 B 2 7

1-(2-フェニルエチルベンジル)イソキノリン

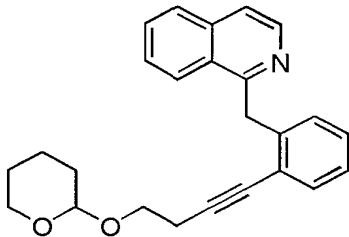


実施例 B 2 6 の化合物 280mg (0.88ミリモル) のテトラヒドロフラン (30ml) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%) 230mg を加え、室温で水素雰囲気下 (1 atm) で 3 時間攪拌した。触媒を濾去し、得られた濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 162mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.90-2.94(2H, m), 3.07-3.10(2H, m), 4.67(2H, s), 6.80(1H, d), 7.02-7.06(1H, m), 7.15-7.30(7H, m), 7.49-7.53(1H, m), 7.58(1H, d), 7.64-7.68(1H, m), 7.84(1H, d), 7.95(1H, d), 8.50(1H, d)

実施例 B 2 8

1-{2-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン



窒素雰囲気下、実施例 B 2 5 の化合物 345mg (1.07ミリモル) のピロリジン (1.5ml) 溶液に、テトラキストリフェニルフォスフィンパラジウム

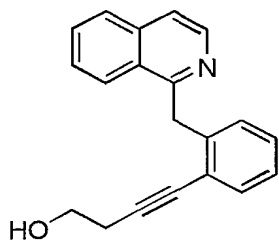
- 76 -

58mg (0.05ミリモル) と2-(3-ブチニルオキシ)-テトラヒドロ-2H-ピラン 208mg (2.0ミリモル) のピロリジン (1.5ml) 溶液を加え、4日間室温で攪拌し、さらに80℃で30分間攪拌した。室温まで冷却後、酢酸エチルで希釈後、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物277mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.42-1.60(4H, m), 1.64-1.68(1H, m), 1.75-1.81(1H, m), 2.76-2.80(2H, m), 3.46-3.51(1H, m), 3.60-3.66(1H, m), 3.85-3.95(2H, m), 4.64-4.66(1H, m), 4.85(2H, s), 6.95-6.98(1H, m), 7.05-7.13(2H, m), 7.44-7.46(1H, m), 7.49-7.53(1H, m), 7.56(1H, d), 7.60-7.65(1H, m), 7.80-7.82(1H, m), 8.15-8.18(1H, m), 8.49-8.51(1H, m)

実施例 B 29

4-[2-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



実施例 B 28 の化合物200mg (0.54ミリモル) を0℃まで冷却した後、塩酸—メタノール溶液 (10%) を5ml加え、15分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物86mgを得た。

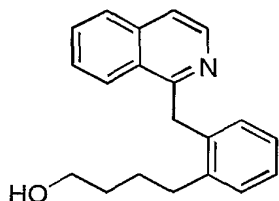
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.72(2H, t), 3.53-3.60(1H, brs), 3.85(2H, t), 4.85(2H, s), 7.12-7.15(2H, m), 7.22-7.24(1H, m), 7.42-7.44(1H, m), 7.55-7.59(2H, m), 7.63-7.67(1H, m), 7.81(1H, d), 8.30

- 77 -

(1H, m), 8.46(1H, m)

実施例 B 3 0

4-[2-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ブタノール

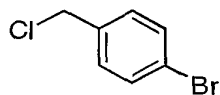


実施例 B 2 9 の化合物 44mg (0.15 ミリモル) のテトラヒドロフラン (5 ml) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%) 10mg を加え、室温で水素雰囲気下 (1 atm) 1 時間攪拌した。触媒を濾去後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 18mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.61-1.75(4H, m), 2.33(1H, brs), 2.77(2H, t), 3.67(2H, t), 4.70(2H, s), 6.91(1H, d), 7.02-7.06(1H, m), 7.12-7.16(1H, m), 7.19-7.21(1H, m), 7.50-7.55(1H, m), 7.57(1H, d), 7.63-7.67(1H, d), 7.83(1H, d), 8.09(1H, d), 8.47(1H, d)

実施例 B 3 1

1-ブロモ-2-(クロロメチル)ベンゼン

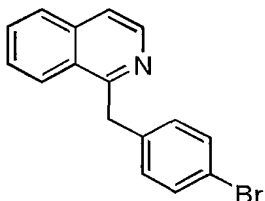


p-ブロモベンジルアルコールを実施例 B 1 と同様にして表題化合物を得た。

実施例 B 3 2

1-(4-ブロモベンジル)イソキノリン

- 78 -

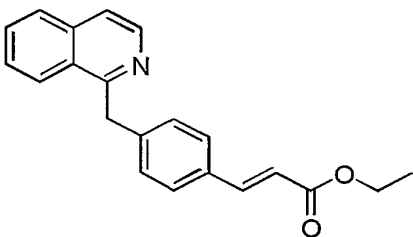


実施例 B 3 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.61(2H, s), 7.14-7.16(2H, m), 7.35-7.39(2H, m), 7.52-7.58(2H, m), 7.63-7.67(1H, m), 7.82(1H, d), 8.07-8.10(1H, m), 8.49(1H, d)

実施例 B 3 3

エチル(E)-3-[4-(イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノエート



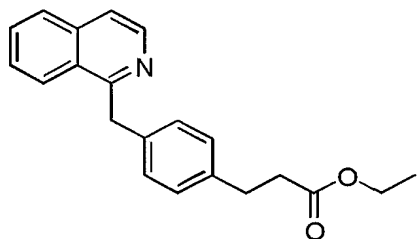
窒素雰囲気下、実施例 B 3 2 の化合物 100mg (0.34ミリモル) とプロピオン酸ビニルエステル 73 μ l (0.67ミリモル) のジメチルホルムアミド 1.0ml 溶液に、トリス (2-メチルフェニル) ホスフィン 20mg (0.067ミリモル)、パラジウム(II)アセテート 7.5mg (0.034ミリモル) そしてトリエチルアミン 70 μ l (0.50ミリモル) を加え、4 時間 100℃で加熱攪拌した。この溶液を室温まで戻した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 74mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.32(3H, t), 4.24(2H, q), 4.69(2H, s), 6.36(1H, d), 7.29(2H, d), 7.42(2H, d), 7.53-7.67(4H, m), 7.83(1H, d), 8.11-8.13(1H, m), 8.50(1H, d)

- 79 -

実施例 B 3 4

エチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノエート

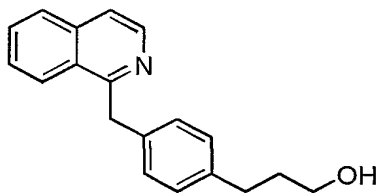


実施例 B 3 3 の化合物 71mg (0.22 ミリモル) のメタノール (5.0ml) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%、20mg) を加え、室温で常圧水素雰囲気下、5 時間半攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 52mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.20(3H, t), 2.56(2H, t), 2.88(2H, t), 4.09(2H, q), 4.64(2H, s), 7.09(2H, d), 7.20(2H, d), 7.51-7.57(2H, m), 7.62-7.66(1H, m), 7.82(1H, d), 8.15(1H, dd), 8.50(1H, d)

実施例 B 3 5

3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-プロパノール



窒素雰囲気下、0 °C に冷却したテトラヒドロフラン 1.0ml にリチウムアルミニウムヒドリド 6mg (0.16 ミリモル) を加えた。この溶液に実施例 B 3 4 の化合物 46mg (0.14 ミリモル) のテトラヒドロフラン (1.0ml) 溶液を加え、その温度で 3 時間攪拌した。反応液にメタノールと水 (9:1, 1.0ml) の混合液を加え、さらに飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減

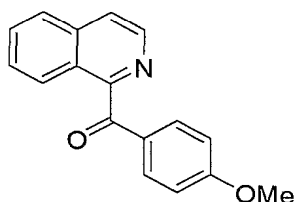
- 80 -

圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物22mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 1.30-1.35(1\text{H}, \text{brs}), 1.81-1.88(2\text{H}, \text{m}), 2.64(2\text{H}, \text{t}), 3.62-3.65(2\text{H}, \text{m}), 4.64(2\text{H}, \text{s}), 7.09(2\text{H}, \text{d}), 7.20(2\text{H}, \text{d}), 7.51-7.57(2\text{H}, \text{m}), 7.62-7.66(1\text{H}, \text{m}), 7.81(1\text{H}, \text{d}), 8.16-8.18(1\text{H}, \text{m}), 8.49(1\text{H}, \text{d})$

実施例 B 3 6

1-イソキノリル(4-メトキシフェニル)ケトン



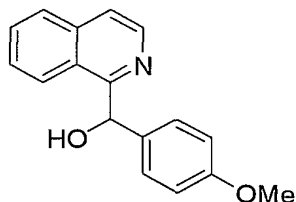
窒素雰囲気下、マグネシウム3059mg(125.8ミリモル)とテトラヒドロフラン(20ml)の混合溶液に、4-ブロモアニソール15.3ml(122ミリモル)と開始剤として触媒量の1, 2-ジブロモエタンを加え、加熱還流下45分間攪拌した。この溶液を0℃まで冷却し、1-イソキノリンカルボニトリル10.78g(69.9ミリモル)のテトラヒドロフラン溶液(30ml)を滴下後、室温で2時間攪拌した。反応混合物を氷冷し、濃塩酸24mlとメタノール120mlを加え、1.5時間加熱還流した。氷冷後、水酸化ナトリウム水溶液を加えpH8とした後、エーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物15.87gを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 3.88(3\text{H}, \text{s}), 6.95(2\text{H}, \text{d}), 7.61(1\text{H}, \text{dd}), 7.74(1\text{H}, \text{dd}), 7.76(1\text{H}, \text{d}), 7.85(2\text{H}, \text{d}), 8.17(1\text{H}, \text{dd}), 8.60(1\text{H}, \text{d})$.

実施例 B 3 7

- 8 1 -

1-イソキノリル(4-メトキシフェニル)メタノール



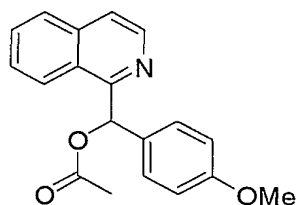
氷冷した実施例 B 3 6 の化合物 8608mg のエタノール (170ml) 溶液に、水素化ホウ素ナトリウム 1855mg を加え、室温で 35 分間攪拌した。さらに水素化ホウ素ナトリウム 957mg を加え 40℃ で 40 分間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、水を加えエーテルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた表題化合物 7881mg はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 3.66 (3H, s), 6.30-6.32 (1H, brs), 6.81 (2H, d), 7.28 (2H, d), 7.54 (1H, dd), 7.68 (1H, dd), 7.76 (1H, d), 7.94 (1H, d), 8.37 (1H, d), 8.47 (1H, d).

水酸基のプロトンは、NMR のチャート上観測されていない。

実施例 B 3 8

1-イソキノリル(4-メトキシフェニル)メチルアセテート



実施例 B 3 7 の化合物 7881mg のピリジン (100ml) 溶液に、無水酢酸 20ml を加え、50℃ で 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、さらにトルエン共沸した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 8.79g を得た。

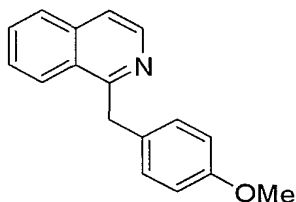
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 2.22 (3H, s), 3.76 (3H, s), 6.84 (2H, d), 7.

- 8 2 -

39(2H, d), 7.54(1H, dd), 7.56(1H, s), 7.60(1H, d), 7.64(1H, d), 7.82(1H, d), 8.19(1H, d), 8.57(1H, d).

実施例 B 3 9

1-(4-メトキシベンジル)イソキノリン

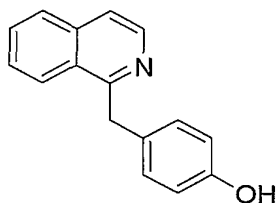


実施例 B 3 8 の化合物 8.79g のメタノール (150ml) 溶液に、10%パラジウム-炭素 4.0g を加え、室温で常圧水素雰囲気下 5.5 時間攪拌した。触媒をセライトで濾去し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 4.48g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.74(3H, s), 4.61(2H, s), 6.79(2H, d), 7.21(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.56(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.16(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 4 0

4-(1-イソキノリルメチル)フェノール



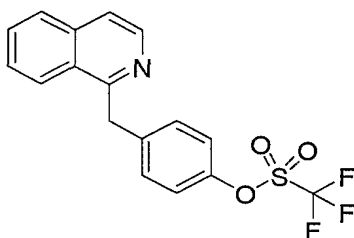
実施例 B 3 9 の化合物 2185mg に 47% 臭化水素酸水溶液 40ml を加え、14 時間加熱還流した。室温まで戻した後、さらに氷冷し 50% 水酸化ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粉末を石油エーテルで洗浄し、表題化合物 1822mg を得た。

- 83 -

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 4.48(2H, s), 6.61(2H, d), 7.07(2H, d), 7.60(1H, dd), 7.68(1H, d), 7.71(1H, dd), 7.92(1H, d), 8.27(1H, d), 8.41(1H, d), 9.19(1H, brs).

実施例 B 4 1

4-(1-イソキノリルメチル)フェニルトリフルオロメタンスルホネート

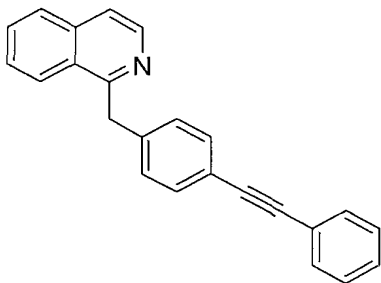


氷冷した実施例 B 4 0 の化合物 513mg のピリジン (10ml) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 0.55ml を滴下し、その温度で 45 分間攪拌した。その反応溶液に氷を加えエーテルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物を 546mg を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 4.69(2H, s), 7.16(2H, d), 7.35(2H, d), 7.57(1H, dd), 7.60(1H, d), 7.68(1H, dd), 7.85(1H, d), 8.09(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 4 2

1-[4-(2-フェニル-1-エチニル)ベンジル]イソキノリン



脱気した後、窒素置換した実施例 B 4 1 の化合物 88mg の *N,N*-ジメチル

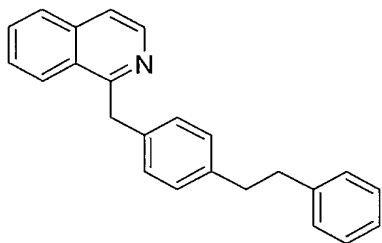
- 84 -

ホルムアミド(2.0ml)溶液に、フェニルアセチレン53 μ l、酢酸パラジウム9mg、1,1'-ビス(ジフェニルフォスフィノ)フェロセン67mg、ヨウ化銅(I)3mg、塩化リチウム20mgそしてトリエチルアミン50 μ lを加え、80°Cで8時間攪拌した。室温まで戻した後、水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物53mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.69(2H, s), 7.12-7.32(3H, m), 7.25(2H, d), 7.42(2H, d), 7.43-7.52(2H, m), 7.54(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.10(1H, d), 8.51(1H, d).

実施例 B 4 3

1-(4-フェネチルベンジル)イソキノリン



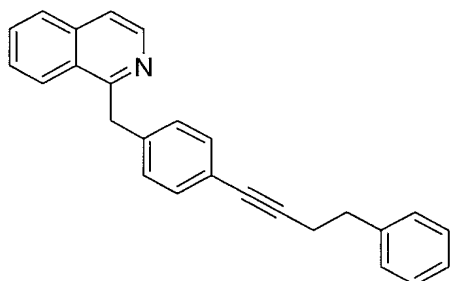
実施例 B 4 2 の化合物45mgのテトラヒドロフラン(2ml)溶液に、10%パラジウム-炭素触媒20mgを加え、室温で常圧水素雰囲気下2時間攪拌した。触媒をセライトで濾去し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物23mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 2.78-2.90(4H, m), 4.64(2H, s), 7.07(2H, d), 7.10-7.20(5H, m), 7.22(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.15(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 4 4

1-[4-(4-フェニル-1-ブチニル)ベンジル]イソキノリン

- 8 5 -

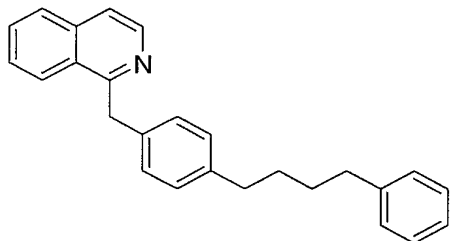


実施例 B 4 1 の化合物と 4-フェニル-1-ブチンを用い、実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.65(2H, t), 2.88(2H, t), 4.68(2H, s), 7.12-7.40(9H, m), 7.50-7.70(3H, m), 7.80-7.88(1H, m), 8.00-8.10(1H, m), 8.48-8.51(1H, m).

実施例 B 4 5

1-[4-(4-フェニル-1-ブチル)ベンジル]イソキノリン



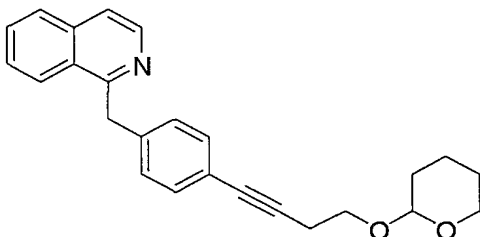
実施例 B 4 4 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.55-1.80(4H, m), 2.50-2.65(4H, m), 4.68(2H, s), 7.00-7.30(9H, m), 7.52(1H, dd), 7.56(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.15(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 4 6

1-{4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン

- 86 -

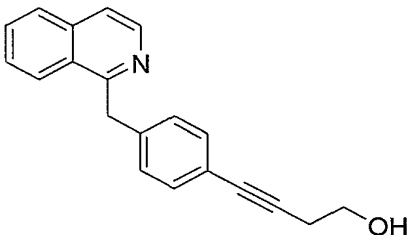


実施例 B 4 1 の化合物と 2-(3-ブチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピランを用い、実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.48-1.90(6H, m), 2.67(2H, t), 3.49-3.55(1H, m), 3.60(1H, dd), 3.65-3.94(2H, m), 4.66(2H, s), 4.65-4.70(1H, m), 7.14-7.20(2H, m), 7.23-7.30(2H, m), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.10(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 4 7

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



実施例 B 4 6 の化合物 1048mg を 10% 塩酸-メタノール溶液 50ml に溶解し、室温で 1.5 時間攪拌した。反応混合物を氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 666mg を得た。

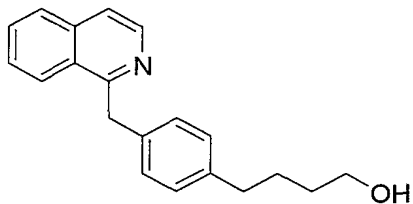
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.65(2H, t), 3.77(2H, t), 4.65(2H, s), 7.18(2H, d), 7.29(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, d), 7.81(1H, d), 8.07(1H, d), 8.49(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMR のチャート上観測されていない。

実施例 B 4 8

- 87 -

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ブタノール



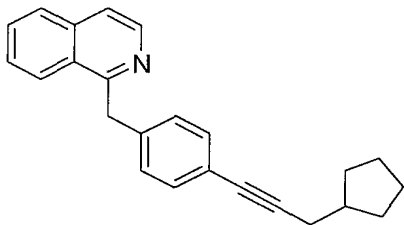
実施例 B 4 7 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.50-1.70(4H, m), 2.57(2H, t), 3.62(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.16(1H, d), 8.49(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 4 9

1-[4-(3-シクロペンチル-1-プロピニル)ベンジル]イソキノリン



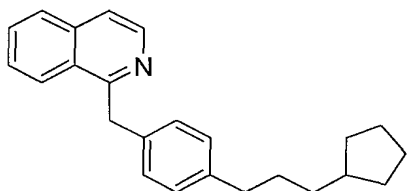
実施例 B 4 1 と 3-シクロペンチル-1-プロピンを用い、実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.25-1.35(2H, m), 1.45-1.70(6H, m), 1.75-1.85(2H, m), 2.05-2.13(1H, m), 4.65(2H, s), 7.17(2H, d), 7.27(2H, d), 7.51(1H, dd), 7.56(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 5 0

1-[4-(3-シクロペンチルプロピル)ベンジル]イソキノリン

- 88 -

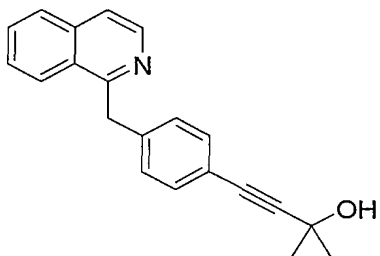


実施例 B 4 9 を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.25-1.74(13H, m), 2.49-2.54(2H, m), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.17(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 5 1

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチン-2-オール

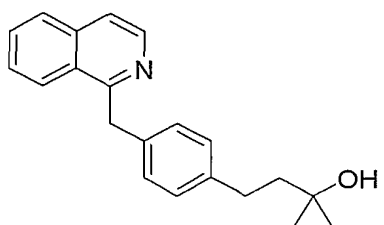


実施例 B 4 1 の化合物と 2-メチル-3-ブチン-2-オールを用いて実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 1.35(1H, s), 1.40(6H, s), 4.62(2H, s), 7.20-7.30(4H, m), 7.61(1H, dd), 7.71(1H, d), 7.69-7.76(1H, m), 7.95(1H, d), 8.26(1H, d), 8.42(1H, d).

実施例 B 5 2

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-2-ブタノール



- 89 -

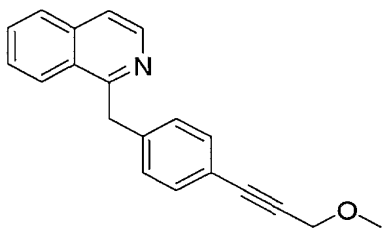
実施例 B 5 1 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.25(6H, s), 1.70-1.77(2H, m), 2.60-2.67(2H, m), 4.64(2H, s), 7.08(2H, d), 7.19(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.16(1H, d), 8.49(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 5 3

1-[4-(3-メトキシ-1-プロピニル)ベンジル]イソキノリン

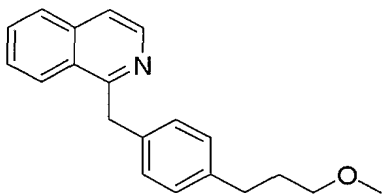


実施例 B 4 1 の化合物とメチルプロパルギルエーテルを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.42(3H, s), 4.29(2H, s), 4.66(2H, s), 7.21(2H, d), 7.34(2H, d), 7.54(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.10(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 5 4

1-[4-(3-メトキシプロピル)ベンジル]イソキノリン



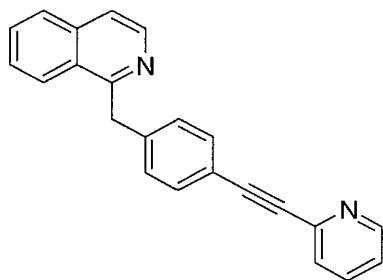
実施例 B 5 3 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

- 9 0 -

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.78-1.87 (2H, m), 2.06(2H, t), 3.31(3H, s), 3.35(2H, t), 4.64(2H, s), 7.07(2H, d), 7.22(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.17(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 5 5

1-[4-[2-(2-ピリジル)-1-エチニル]ベンジル]イソキノリン

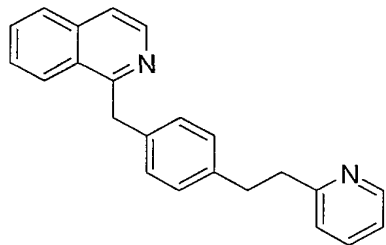


実施例 B 4 1 の化合物と 2-エチニルピリジンを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 4.71(2H, s), 7.20-7.25(2H, m), 7.29(2H, d), 7.48-7.53(1H, m), 7.51(2H, d), 7.57(1H, dd), 7.61(1H, d), 7.67(1H, dd), 7.85(1H, d), 8.13(1H, d), 8.53(1H, d), 8.59-8.63 (1H, m).

実施例 B 5 6

1-[4-[2-(2-ピリジル)エチル]ベンジル]イソキノリン



実施例 B 5 5 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理して表題化合物を得た。

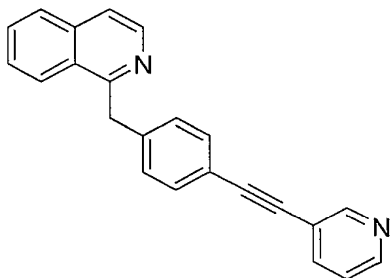
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.94-3.06(4H, m), 4.64(2H, s), 7.04(1H,

- 9 1 -

d), 7.09(1H, dd), 7.09(2H, d), 7.18(2H, d), 7.53(1H, ddd), 7.54(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.64(1H, d), 7.81(1H, d), 8.15(1H, d), 8.49(1H, d), 8.53(1H, dd).

実施例 B 5 7

1-{4-[2-(3-ピリジル)-1-エチニル]ベンジル}イソキノリン

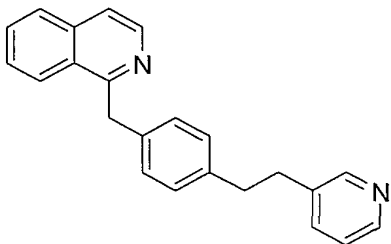


実施例 B 4 1 の化合物と 3-エチニルピリジンを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.69(2H, s), 7.27(2H, d), 7.31(1H, dd), 7.43(2H, d), 7.55(1H, dd), 7.59(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.82(1H, d dd), 7.83(1H, d), 8.10(1H, d), 8.51(1H, d), 8.60(1H, dd), 8.77(1H, d).

実施例 B 5 8

1-{4-[2-(3-ピリジル)エチル]ベンジル}イソキノリン



実施例 B 5 7 を実施例 B 4 3 と同様に処理し、表題化合物を得た。

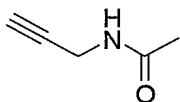
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 2.80-2.90(4H, m), 4.65(2H, s), 7.04(2H, d), 7.15(1H, dd), 7.19(2H, d), 7.39(1H, dd), 7.54(1H, dd), 7.56(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.15(1H, d), 8.40(1H, d), 8.

- 9 2 -

4.2(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 5 9

N-(2-プロピニル)アセトアミド

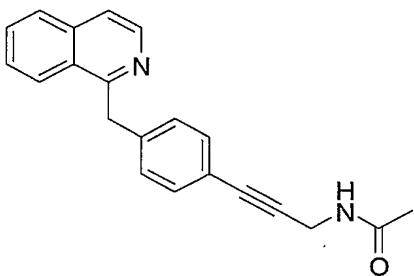


氷冷したプロパルギルアミン3023mgの塩化メチレン(30ml)溶液に、ピリジン16.3mlと無水酢酸10.4mlを加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を氷に注ぎ、酢酸エチルで抽出し、1規定塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲルを用いて濾過した。減圧濃縮し、表題化合物743mgを得た。得られた化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 1.79(3H, s), 3.07(1H, t), 3.81(2H, d), 8.25(1H, brs).

実施例 B 6 0

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}アセトアミド



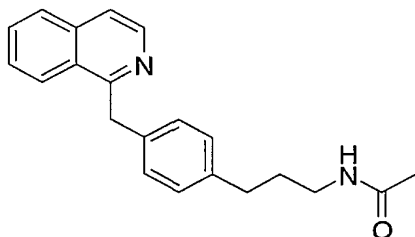
実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 5 9 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 1.79(3H, s), 4.04(2H, s), 4.61(2H, s), 7.45-7.68(4H, m), 7.68-7.75(2H, m), 7.90-8.00(1H, m), 8.25-8.38(2H, m), 8.40-8.45(1H, m).

- 93 -

実施例 B 6 1

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}アセトアミド

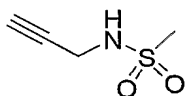


実施例 B 6 0 を実施例 B 4 3 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.95(3H, s), 1.74-1.84(2H, m), 2.55(2H, t), 3.25(2H, dt), 4.68(2H, s), 7.10(2H, d), 7.18(2H, d), 7.20-7.28(1H, m), 7.50-7.58(2H, m), 7.60-7.68(1H, m), 7.75-7.85(1H, m), 8.10-8.16(1H, m), 8.45-8.50(1H, m).

実施例 B 6 2

N-(2-プロピニル)メタンスルホンアミド



氷冷したプロパルギルアミン3023mgの塩化メチレン(30ml)溶液に、トリエチルアミン9.77mlを加え、メタンスルホニルクロリド5.19mlを滴下した後、その温度で3時間攪拌し、その後室温に昇温し、さらに2時間攪拌した。反応混合物に氷を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をメタノール120mlに溶解し、炭酸カリウム11.7gを加え、室温で3時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、氷冷下希塩酸で中和した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物6.67gを得た。

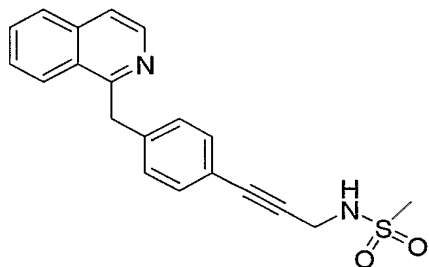
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.39(1H, t), 3.10(3H, s), 3.99(2H, dd), 4.

- 9 4 -

60(1H, brs).

実施例 B 6 3

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}メタンスルホンアミド

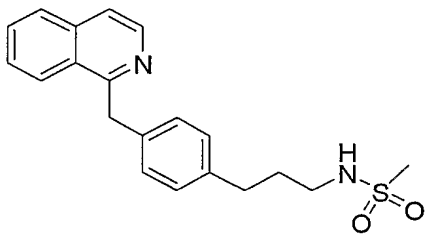


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 6 2 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta (\text{ppm}): 2.97(3\text{H}, \text{s}), 4.00(2\text{H}, \text{d}), 4.63(2\text{H}, \text{s}), 7.25\text{--}7.37(4\text{H}, \text{m}), 7.57(1\text{H}, \text{t}), 7.62(1\text{H}, \text{dd}), 7.71(1\text{H}, \text{d}), 7.73(1\text{H}, \text{dd}), 7.94(1\text{H}, \text{d}), 8.28(1\text{H}, \text{d}), 8.42(1\text{H}, \text{d}).$

実施例 B 6 4

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}メタンスルホンアミド



実施例 B 6 3 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理し、表題化合物を得た。

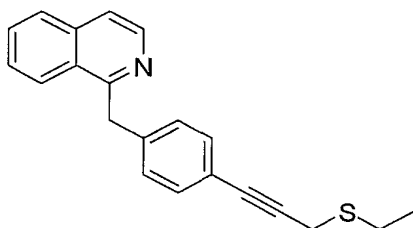
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 1.80\text{--}1.90(2\text{H}, \text{m}), 2.62(2\text{H}, \text{t}), 2.89(3\text{H}, \text{s}), 3.11(2\text{H}, \text{dt}), 4.25(1\text{H}, \text{brs}), 4.64(2\text{H}, \text{s}), 7.05(2\text{H}, \text{d}), 7.20(2\text{H}, \text{d}), 7.50(1\text{H}, \text{dd}), 7.56(1\text{H}, \text{d}), 7.63(1\text{H}, \text{dd}), 7.81(1\text{H}, \text{d}),$

- 9 5 -

8.15(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 6 5

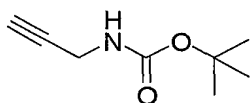
1-{4-[3-(エチルスルファニル)-1-プロピニル]ベンジル}イソキノリン



実施例 B 4 1 の化合物とプロパルギルエチルスルフィドを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.30(3H, t), 2.73(2H, q), 3.47(2H, s), 4.67(2H, s), 7.20-7.32(4H, m), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 6 6

tert-ブチル *N*-(2-プロピニル)カルバメート

氷冷したプロパルギルアミン 3040mg のテトラヒドロフラン (20ml) 溶液に、ジ-tert-ブチル-ジカルボナート 10.84g のテトラヒドロフラン溶液 (20ml) を滴下し、徐々に室温まで昇温し、20時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物 9.34g を得た。得られた化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

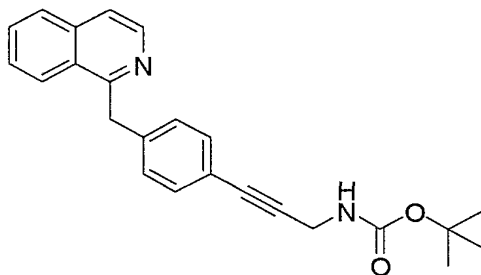
$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 1.36(9H, s), 3.04(1H, t), 3.62-3.70(2H, m), 7.20-7.30(1H, m)

実施例 B 6 7

tert-ブチル *N*-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}

- 9 · 6 -

ル}カルバメート

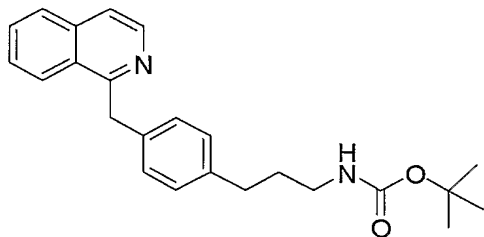


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 6 6 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.45(9H, s), 4.06-4.13(2H, m), 4.66(2H, s), 7.19(2H, d), 7.20-7.28(1H, m), 7.29(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 6 8

tert-ブチル *N*-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}カルバメート



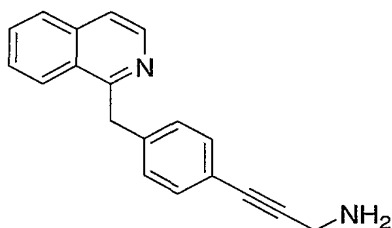
実施例 B 6 7 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.43(9H, s), 1.70-1.81(2H, m), 2.54-2.60(2H, m), 3.01-3.20(2H, m), 4.47-4.57(1H, m), 4.65(2H, s), 7.07(2H, d), 7.21(2H, d), 7.55(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.18(1H, d), 8.51(1H, d).

実施例 B 6 9

- 9 7 -

3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピン-1-アミン



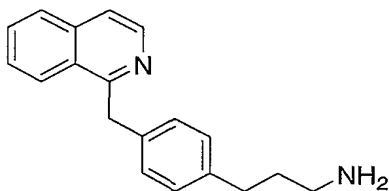
氷冷した実施例 B 6 7 の化合物 4mg の塩化メチレン (0.6ml) 溶液に、トリフルオロ酢酸 0.3ml を加え、その温度で 1 時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物を 4mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.60-3.68 (2H, m), 4.66 (2H, s), 7.19 (2H, d), 7.29 (2H, d), 7.53 (1H, dd), 7.56 (1H, d), 7.63 (1H, dd), 7.82 (1H, d), 8.10 (1H, d), 8.49 (1H, d).

アミンのプロトンは、NMR のチャート上観測されていない。

実施例 B 7 0

3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-プロパンアミン

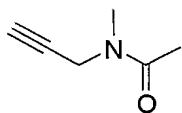


実施例 B 6 8 の化合物を実施例 B 6 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.20-1.30 (2H, m), 1.78-1.88 (2H, m), 2.45-2.52 (2H, m), 2.73-2.81 (2H, m), 4.55 (2H, s), 6.94 (2H, d), 7.08 (2H, d), 7.50 (1H, dd), 7.51 (1H, d), 7.61 (1H, dd), 7.76 (1H, d), 8.10 (1H, d), 8.38 (1H, d).

- 9 8 -

実施例 B 7 1

N-メチル-*N*-(2-プロピニル)アセトアミド

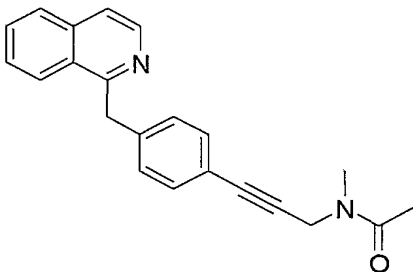
N-メチル-*N*-(2-プロピニル)アミンを実施例 B 5 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 2.11(2.1\text{H}, \text{s}), 2.17(0.9\text{H}, \text{s}), 2.21(0.7\text{H}, \text{t}), 2.31(0.3\text{H}, \text{t}), 3.00(0.9\text{H}, \text{s}), 3.08(2.1\text{H}, \text{s}), 4.04(0.6\text{H}, \text{d}), 4.23(1.4\text{H}, \text{d}).$

なお、この化合物はアミド幾何異性体の7:3の混合物である。

実施例 B 7 2

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル} *N*-メチルアセトアミド



実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 7 1 の化合物を実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

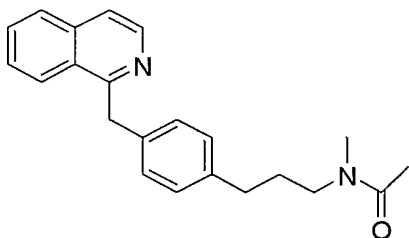
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 2.10(1.8\text{H}, \text{s}), 2.11(1.2\text{H}, \text{s}), 3.01(1.2\text{H}, \text{s}), 3.10(1.8\text{H}, \text{s}), 4.21(1.2\text{H}, \text{s}), 4.41(0.8\text{H}, \text{s}), 4.67(2\text{H}, \text{s}), 7.18-7.23(2\text{H}, \text{m}), 7.29-7.32(2\text{H}, \text{m}), 7.53(1\text{H}, \text{dd}), 7.58(1\text{H}, \text{d}), 7.65(1\text{H}, \text{dd}), 7.82(1\text{H}, \text{d}), 8.09(1\text{H}, \text{d}), 8.49(1\text{H}, \text{d}).$

なお、この化合物はアミド幾何異性体の3:2の混合物である。

実施例 B 7 3

- 9 9 -

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}- *N*1-メチルアセトアミド



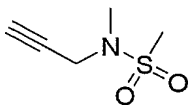
実施例 B 7 2 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.70-1.90(2H, m), 1.89(1.5H, s), 2.03(1.5H, s), 2.50-2.59(2H, m), 2.88(1.5H, s), 2.91(1.5H, s), 3.20-3.25(1H, m), 3.36-3.40(1H, m), 4.66(2H, s), 7.03-7.10(2H, m), 7.18-7.30(2H, m), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.17(1H, d), 8.50(1H, d).

なお、この化合物はアミド幾何異性体の1:1の混合物である。

実施例 B 7 4

N-メチル- *N*-(2-プロピニル)メタンスルホンアミド



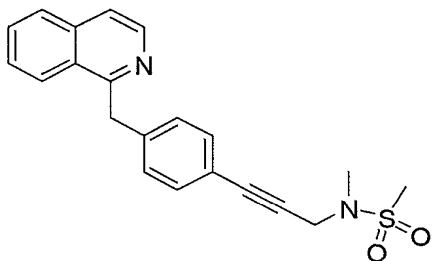
氷冷した *N*-メチル- *N*-(2-プロピニル)アミン2603mgの塩化メチレン(25ml)溶液に、トリエチルアミン6.55mlを加えた後、メタンスルホンクロリド3.50mlを滴下後、その温度で1時間攪拌し、さらに室温で2時間攪拌した。反応混合物に氷を加え、酢酸エチルで抽出し、1規定塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、シリカゲル濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物4522mgを得た。得られた化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

- 1 0 0 -

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.41(1H, t), 2.93(3H, s), 2.96(3H, s), 4.09(2H, d).

実施例 B 7 5

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}-*N*-メチルメタンスルホンアミド

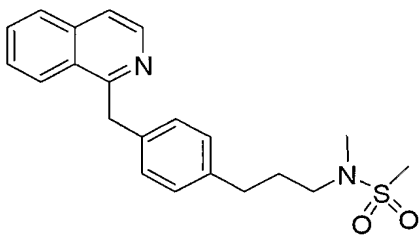


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 7 4 の化合物を実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.95(3H, s), 2.97(3H, s), 4.26(2H, s), 4.68(2H, s), 7.24(2H, d), 7.31(2H, d), 7.55(1H, dd), 7.59(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.10(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 7 6

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}-*N*-メチルメタンスルホンアミド



実施例 B 7 5 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に反応させ、残査は LC-MS [溶出溶媒 : 0.1% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液 : 0.1% トリフルオロ酢酸含有水溶液 = 1 : 99 ~ 100 : 0 / 20 分サイクル、流速 : 20 ml/分、カラム : YMC Combiprep ODS-AM, 20 mm Φ x 50 mm (long)] により分離精製

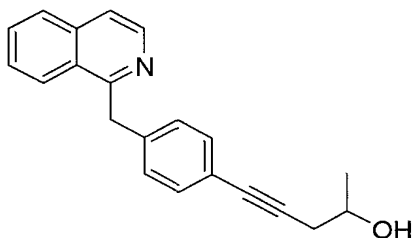
- 1 0 1 -

し、表題化合物を得た。

MS m/z (ESI:MH⁺):369.2

実施例 B 7 7

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチン-2-オール



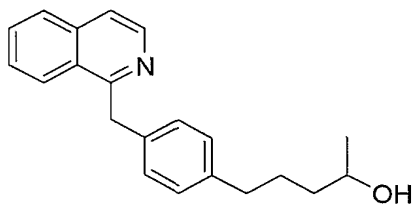
実施例 B 4 1 の化合物と 4-ペンチン-2-オールを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.27(3H, t), 2.38-2.62(2H, m), 3.95-4.03(1H, m), 4.65(2H, s), 7.19(2H, d), 7.29(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.08(1H, d), 8.48(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 7 8

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-ペンタノール



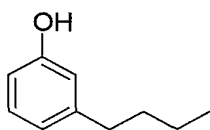
実施例 B 7 7 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に反応させ、残査はLC-MS[溶出溶媒: 0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液: 0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1: 99~100: 0/20分サイクル、流速: 20ml/分、カラム: YMC Combiprep ODS-AM, 20mmΦ x 50mm(long)]により分離精製し、表題化合物を得た。

- 1 0 2 -

MS m/z (ESI: MH^+): 306.2

実施例 B 7 9

3-ブチルフェノール

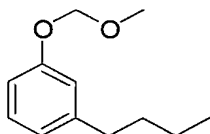


1-ブチル-3-メトキシベンゼンを実施例 B 4 0 と同様に処理し表題化合物を得た。

1H -NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 0.94(3H, t), 1.30-1.55(2H, m), 1.55-1.62(2H, m), 2.56(2H, t), 4.76(1H, brs), 6.63(1H, dd), 6.66(1H, d), 6.75(1H, d), 7.12(1H, dd).

実施例 B 8 0

1-ブチル-3-(メトキシメトキシ)ベンゼン



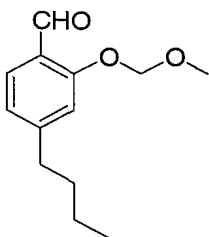
氷冷した実施例 B 7 9 の化合物 318mg のジメチルホルムアミド (5ml) 溶液に、60% 鉍油分散の水素化ナトリウム 102mg を加え、室温で 30 分間攪拌した。再度氷冷し、クロロメチルメチルエーテル 0.18ml を加え、室温で 12 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲル濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物 341mg を得た。得られた化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

1H -NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 0.94(3H, t), 1.30-1.42(2H, m), 1.55-2.04(2H, m), 2.58(2H, t), 3.49(3H, s), 5.17(2H, s), 6.80-6.87(3H, m), 7.18(1H, dd).

- 1 0 3 -

実施例 B 8 1

4-ブチル-2-(メトキシメトキシ)ベンズアルデヒド

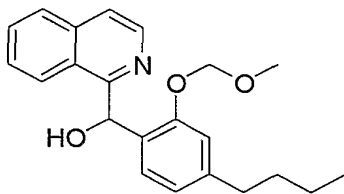


-20℃に冷却した実施例 B 8 0 の化合物2396mgの石油エーテル溶液に、*t*-ブチルリチウムのペンタン溶液(1.51M)10.6mlを滴下し、-10℃から0℃の温度範囲で1.5時間攪拌した。その反応溶液を-70℃に冷却し、無水エーテル17ml、ジメチルホルムアミド1.91mlを加え、その温度で3時間攪拌し、室温でさらに1時間攪拌した。反応混合物を氷冷し、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物1821mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.94(3H, t), 1.32-1.42(2H, m), 1.57-1.65(2H, m), 2.64(2H, t), 3.54(3H, s), 5.29(2H, s), 6.91(1H, d), 7.01(1H, s), 7.76(1H, d), 10.44(1H, s).

実施例 B 8 2

[4-ブチル-2-(メトキシメトキシ)フェニル](1-イソキノリル)メタノール



Org. Synth., IV, 115(1988)の文献に基づいて合成した1-シアノ-ベンゾイル-1,2-ジヒドロイソキノリン815mg、実施例 B 8 1 の化合物869mg

- 1 0 4 -

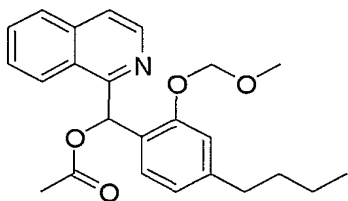
gそしてトリエチルベンジルアンモニウムクロリド7mgの塩化メチレン(1.6ml)溶液に、50%水酸化ナトリウム水溶液1.4mlを加え、10分間水浴中で超音波を照射した。反応混合物に塩化メチレン8.3mlとエタノール4.4mlを加え、さらに85分間水浴中で超音波を照射した。反応混合物に水を加え、塩化メチレンで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物1144mgを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 0.86(3H, t), 1.22-1.31(2H, m), 1.44-1.52(2H, m), 2.44-2.51(2H, m), 3.16(3H, s), 5.10(1H, d), 5.12(1H, d), 6.72(1H, s), 6.75(1H, d), 6.84(1H, s), 7.21(1H, d), 7.61(1H, dd), 7.72(1H, dd), 7.74(1H, d), 7.95(1H, d), 8.31(1H, d), 8.42(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 8 3

[4-ブチル-2-(メトキシメトキシ)フェニル](1-イソキノリル)メチルアセテート



実施例 B 8 2 の化合物を実施例 B 3 8 と同様に処理し、表題化合物を得た。

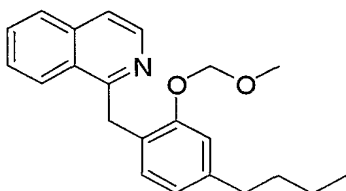
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.40(2H, m), 1.50-1.60(2H, m), 2.22(3H, s), 2.54(2H, t), 3.41(3H, s), 5.22(1H, d), 5.26(1H, d), 6.77(1H, d), 6.94(1H, s), 7.29(1H, d), 7.55(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.70(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.05(1H, s), 8.35(1H,

- 1 0 5 -

d), 8.55(1H, d).

実施例 B 8 4

1-[4-ブチル-2-(メトキシメトキシ)ベンジル]イソキノリン

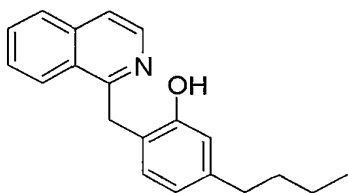


実施例 B 8 3 の化合物を実施例 B 3 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.28-1.37(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.53(2H, t), 3.46(3H, s), 4.65(2H, s), 5.24(2H, s), 6.66(1H, dd), 6.89(1H, d), 6.92(1H, d), 7.51(1H, dd), 7.53(1H, d), 7.62(1H, dd), 7.79(1H, d), 8.23(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 8 5

5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール



実施例 B 8 4 の化合物 88mg のメタノール (1.5ml) 溶液に、5 規定塩酸 1.0ml を加え、室温で 14 時間攪拌した。5 規定水酸化ナトリウム水溶液にて中和した後、リン酸緩衝液で pH を 6.8 に調整し酢酸エチルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物 44mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.23-1.37(2H, m), 1.48-1.60(2H, m), 2.51(2H, t), 4.56(2H, s), 6.65(1H, dd), 6.82(1H, d), 7.21(1H, d), 7.55(1H, d), 7.68(1H, dd), 7.72(1H, dd), 7.82(1H,

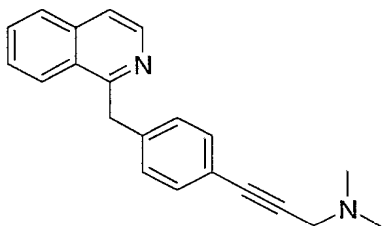
- 1 0 6 -

d), 8.35(1H, d), 8.44(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 8 6

N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}-*N,N*-ジメチルアミン

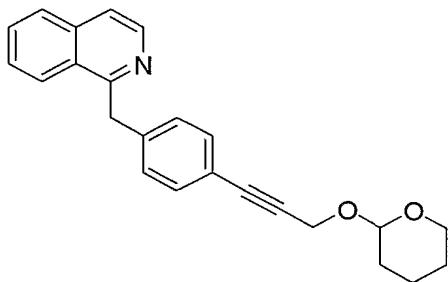


実施例 B 4 1 の化合物と1-ジメチルアミノ-2-プロピンを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.04(3H, s), 2.34(3H, s), 3.47(2H, s), 4.66(2H, s), 7.20(2H, d), 7.32(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.56(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.10(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 8 7

1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-プロピニル]ベンジル}イソキノリン



実施例 B 4 1 の化合物とテトラヒドロ-2-(2-プロピニルオキシ)-2H-ピランを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

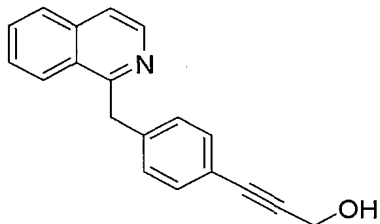
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.45-1.85(6H, m), 3.50-3.60(1H, m), 3.84-3.90(1H, m), 4.42(1H, d), 4.48(1H, d), 4.66(2H, s), 4.87(1H, dd),

- 1 0 7 -

7.15-7.21(2H, m), 7.33-7.36(2H, m), 7.50-7.70(3H, m), 7.81-7.86(1H, m), 8.07-8.10(1H, m), 8.48-8.51(1H, m).

実施例 B 8 8

3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピン-1-オール

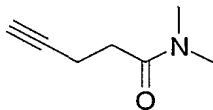


実施例 B 8 7 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.20-1.30(1H, m), 4.46(2H, s), 4.67(2H, s), 7.23(2H, d), 7.31(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 8 9

N,N-ジメチル-4-ペンチンアミド



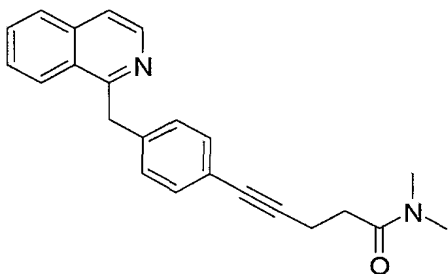
4-ペンチノイック酸552mgの塩化メチレン(150ml)溶液に、ジメチルアミン(2Mテトラヒドロフラン溶液)8.53ml、トリエチルアミン2.59mlそして1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド3221mgを加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物を1規定塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水そして飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物129mgを得た。得られた化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.96-1.99(1H, m), 2.50-2.60(4H, m), 2.96(3H, s), 3.02(3H, s).

- 1 0 8 -

実施例 B 9 0

N,N-ジメチル-5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチンアミド

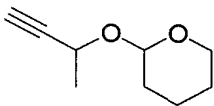


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 8 9 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.59-2.64(2H, m), 2.71-2.75(2H, m), 2.96(3H, s), 3.03(3H, s), 4.66(2H, s), 7.18(2H, d), 7.28(2H, d), 7.43-7.70(3H, m), 7.90(1H, d), 8.09(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 9 1

1-メチル-2-プロピニルテトラヒドロ-2H-2-ピラニルエーテル



3-ブチン-2-オール3051mgのジクロロメタン(150ml)溶液に、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン7.15mlとピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸2187mgを加え、室温で29時間攪拌した。

反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水そして飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物を4698mgを得た。

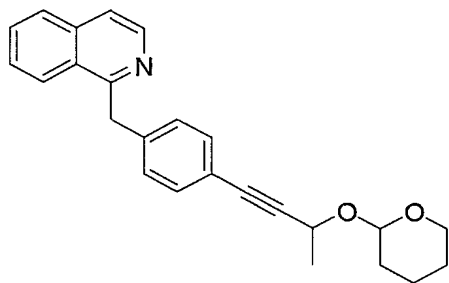
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.45(1.05H, d), 1.48(1.95H, d), 1.50-1.90(6H, m), 2.37(0.65H, d), 2.43(0.35H, d), 3.50-3.60(1.3H, m), 3.80-3.86(0.7H, m), 4.4-3-4.50(0.35H, m), 4.52-4.60(0.65H, m), 4.7

- 1 0 9 -

7(0.35H, t), 4.94(0.65H, t).

実施例 B 9 2

1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン

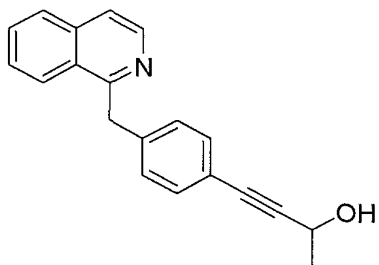


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 9 1 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.40-1.80(6H, m), 1.49(1.05H, d), 1.52(1.95H, d), 3.49-3.60(1H, m), 3.80-3.88(0.65H, m), 3.99-4.06(0.35H, m), 4.65(2H, s), 4.74(1H, q), 4.83(0.35H, t), 4.97(0.65H, t), 7.18-7.22(2H, m), 7.32(2H, d), 7.54(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 9 3

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-2-オール



実施例 B 9 2 の化合物を実施例 B 4 7 と同様の方法で処理し、表題化合物を得た。

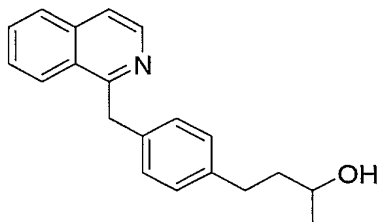
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.53(3H, d), 2.15(1H, brs), 4.68(2H, s),

- 1 1 0 -

4.72(1H, q), 7.21(2H, d), 7.31(2H, d), 7.54(1H, dd), 7.59(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.84(1H, d), 8.10(1H, d), 8.51(1H, d).

実施例 B 9 4

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-ブタノール

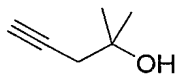


実施例 B 9 3 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に反応させ、残査はLC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1：99～100：0/20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM, 20mmΦ x 50mm(long)]により分離精製し、表題化合物を得た。

MS m/z (ESI: MH^+): 292.2

実施例 B 9 5

2-メチル-4-ペンチン-2-オール



0℃に冷却したイソブチレンオキシド1889mgのテトラヒドロフラン(13 ml)とジメチルスルホキシド(20ml)の混合溶液に、リチウムアセチリド-エチレンジアミン錯体を少しずつ加え、0℃にて5時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲルを用いて濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物3316mgを得た。このものはそれ以上精製することなく次反応に用いた。

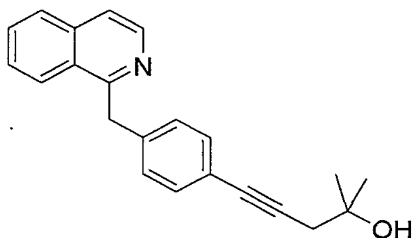
1H -NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 1.33(6H, s), 2.09(1H, t), 2.38(2H, t).

- 1 1 1 -

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 9 6

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-4-ペンチン-2-オール

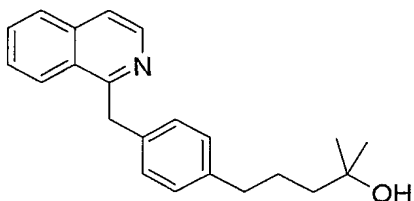


実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 9 5 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 1.18(6H, s), 2.28(1H, s), 2.42(2H, s), 4.62(2H, s), 7.10-7.30(4H, m), 7.62(1H, dd), 7.71(1H, d), 7.72(1H, dd), 7.94(1H, d), 8.27(1H, d), 8.42(1H, d).

実施例 B 9 7

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-2-ペンタノール



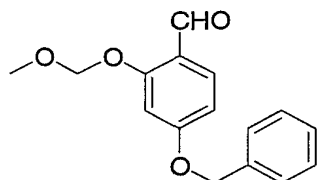
実施例 B 9 6 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に反応させ、残査はLC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1：99～100：0/20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM, 20mm Φ x 50mm(long)]により分離精製し、表題化合物を得た。

MS m/z (ESI:MH $^+$):320.2

実施例 B 9 8

- 1 1 2 -

4-ベンジルオキシ-2-(メトキシメトキシ)ベンズアルデヒド

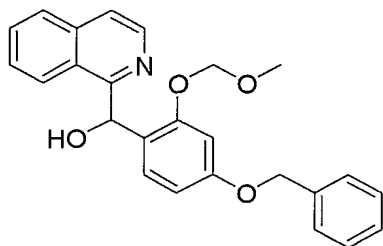


4-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシベンズアルデヒド2071mgのテトラヒドロフラン(30ml)溶液に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン1.98mlとクロロメチルメチルエーテル0.76mlを加え、加熱還流下19時間攪拌した。この反応溶液に*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン2.7mlとクロロメチルメチルエーテル1.04mlを加え、加熱還流下さらに10時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲル及びアルミナを用いて濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物2470mgを得た。この化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.52(3H, s), 5.12(2H, s), 5.27(2H, s), 6.68(1H, dd), 6.80(1H, d), 7.33-7.45(5H, m), 7.82(1H, d), 10.33(1H, s).

実施例 B 9 9

[4-(ベンジルオキシ)-2-(メトキシメトキシ)フェニル](1-イソキノリル)メタノール



実施例 B 9 8 の化合物を実施例 B 8 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 3.16(3H, s), 5.01(2H, s), 5.11(1H, d),

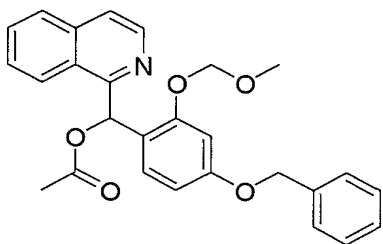
- 1 1 3 -

5.14(1H, d), 6.59(1H, dd), 6.66-6.70(2H, m), 7.18(1H, d), 7.31(1H, d), 7.34-7.42(4H, m), 7.61(1H, dd), 7.71(1H, d), 7.75(1H, d), 7.95(1H, d), 8.28(1H, d), 8.43(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 1 0 0

[4-(ベンジルオキシ)-2-(メトキシメトキシ)フェニル](1-イソキノリル)メチル アセテート

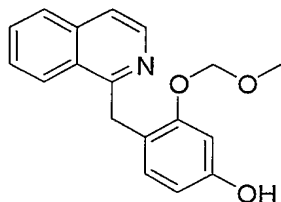


実施例 B 9 9 の化合物を実施例 B 3 8 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.21(3H, s), 3.42(3H, s), 4.98(1H, d), 5.00(1H, d), 5.21-5.27(2H, m), 6.54(1H, dd), 6.81(1H, d), 7.25(1H, d), 7.30-7.41(5H, m), 7.53(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.63(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.00(1H, s), 8.29(1H, d), 8.55(1H, d).

実施例 B 1 0 1

4-(1-イソキノリルメチル)-3-(メトキシメトキシ)フェノール



実施例 B 1 0 0 の化合物を実施例 B 3 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

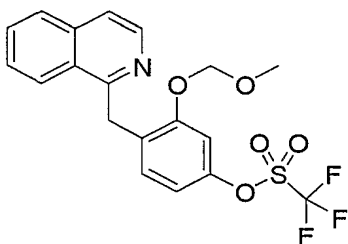
$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 3.36(3H, s), 4.44(2H, s), 5.17(2H, s),

- 1 1 4 -

6.22(1H, d), 6.52(1H, s), 6.67(1H, d), 7.57-7.76(3H, m), 7.92(1H, d), 8.22(1H, d), 8.37(1H, d), 9.24(1H, brs).

実施例 B 1 0 2

4-(1-イソキノリルメチル)-3-(メトキシメトキシ)フェニルトリフルオロメタンスルホネート

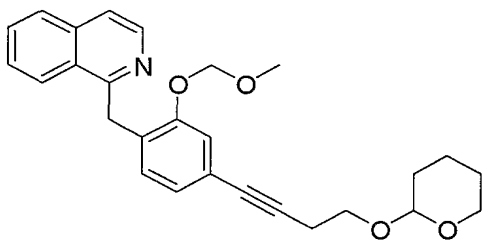


実施例 B 1 0 1 の化合物を実施例 B 4 1 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.43(3H, s), 4.65(2H, s), 5.24(2H, s), 6.77(1H, dd), 7.04(1H, d), 7.07(1H, d), 7.54-7.61(2H, m), 7.67(1H, dd), 7.84(1H, d), 8.16(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 1 0 3

1-{2-(メトキシメトキシ)-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン



実施例 B 1 0 2 の化合物と 2-(3-ブチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピランを用い、実施例 B 4 2 と同様に処理して表題化合物を得た。

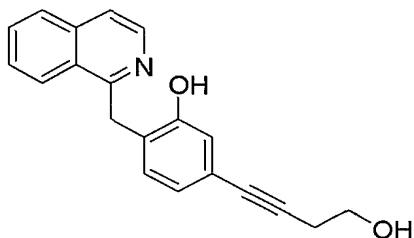
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.51-1.90(6H, m), 2.68(2H, t), 3.50(3H, s), 3.49-3.55(1H, m), 3.58-3.65(1H, m), 3.84-3.94(2H, m), 4.63-4.68(1H, m), 4.65(2H, s), 5.23(2H, s), 6.76(1H, dd), 7.04(1H,

- 1 1 5 -

d), 7.07(1H, d), 7.49-7.69(3H, m), 7.81(1H, d), 8.14(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 1 0 4

5-(4-ヒドロキシ-1-ブチニル)-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール



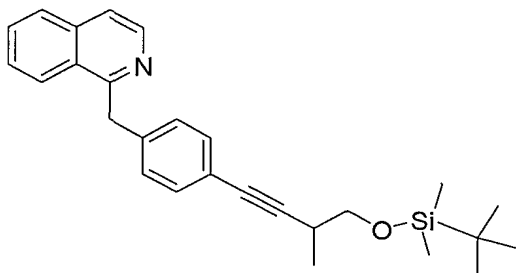
実施例 B 1 0 3 の化合物を実施例 B 8 5 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.80(1H, brs), 2.66(2H, t), 3.73-3.82(2H, m), 4.58(2H, s), 6.87(1H, d), 7.04(1H, s), 7.23(1H, d), 7.60(1H, d), 7.69-7.78(2H, m), 7.86(1H, d), 8.37(1H, d), 8.42(1H, d).

フェノール性水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 1 0 5

1-(t-ブチル)-1,1-ジメチルシリル{4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチニル}エーテル



氷冷した四臭化炭素11.19gの塩化メチレン(60ml)溶液に、トリフェニルフォスフィン18.37gを加え、その温度で1時間攪拌した。この溶液にTetrahedron Lett., 4347 (1979)の文献に基づいて合成した3-{[1-(t-ブ

- 1 1 6 -

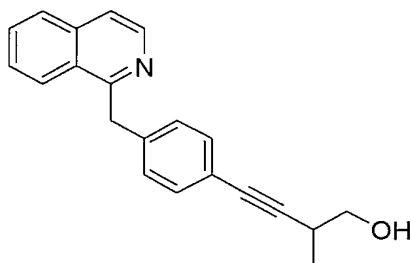
チル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}-2-メチルプロパナールの塩化メチレン溶液(14ml)を滴下し、さらに1時間攪拌した。反応混合物を塩化メチレンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化アンモニウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。このものにエーテルを加え不溶物を濾別し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、*t*-ブチル[(4,4-ジブromo-2-メチル-3-ブテニル)オキシ]ジメチルシラン2385mgを得た。

次いで、-70℃に冷却した*t*-ブチル[(4,4-ジブromo-2-メチル-3-ブテニル)オキシ]ジメチルシラン1326mgのテトラヒドロフラン(10ml)溶液に*n*-ブチルリチウム2.47Mヘキサン溶液3.15mlを滴下し、その温度で1時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、室温に昇温した。反応混合物に水を加え、エーテルで抽出した。エーテル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲル濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣と実施例B 4 1の化合物を実施例B 4 2と同様に処理して、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 0.07(6\text{H}, \text{s}), 0.90(9\text{H}, \text{s}), 1.18(3\text{H}, \text{d}), 2.70-2.80(1\text{H}, \text{m}), 3.47(1\text{H}, \text{dd}), 3.70(1\text{H}, \text{dd}), 4.65(2\text{H}, \text{s}), 7.16(2\text{H}, \text{d}), 7.27(2\text{H}, \text{d}), 7.51(1\text{H}, \text{dd}), 7.56(1\text{H}, \text{d}), 7.64(1\text{H}, \text{dd}), 7.81(1\text{H}, \text{d}), 8.07(1\text{H}, \text{d}), 8.49(1\text{H}, \text{d}).$

実施例 B 1 0 6

4-[4-(1--イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチン-1-オール



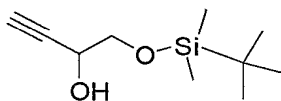
- 1 1 7 -

実施例 B 1 0 5 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6)\delta$ (ppm): 1.11(3H, d), 2.60-2.70(1H, m), 3.28(1H, d), 3.44(1H, d), 4.58(2H, s), 4.85-4.90(1H, m), 7.23(4H, s), 7.61(1H, dd), 7.70(1H, d), 7.71(1H, dd), 7.93(1H, d), 8.25(1H, d), 8.42(1H, d).

実施例 B 1 0 7

1-{[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}-3-ブチン-2-オール



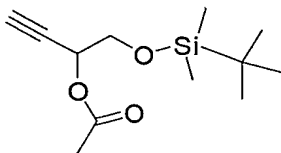
窒素雰囲気下、無水テトラヒドロフラン20mlを-78°Cに冷却し、エチニルマグネシウムブロミド0.5モルのテトラヒドロフラン溶液90mlを加えた。この溶液に*t*-ブチルジメチルシロキシアセトアルデヒド6000mgのテトラヒドロフラン溶液(30ml)を滴下した。-78°Cで45分間、室温に昇温し1時間40分攪拌した。反応混合物を氷冷し、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、エーテルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲルを用いて濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物8.55gを得た。この化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.08(6H, s), 0.91(9H, s), 2.43 (1H, d), 2.60-2.66(1H, m), 3.65-3.70(1H, m), 3.73-3.81(1H, m), 4.38-4.42 (1H, m).

実施例 B 1 0 8

1-{[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}メチル)-2-プロピニルアセテート

- 1 1 8 -

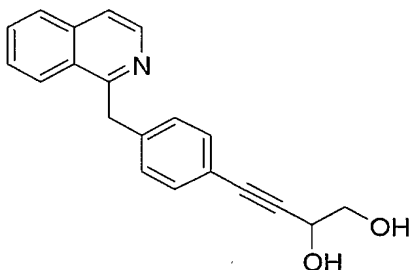


実施例 B 1 0 7 の化合物を実施例 B 3 8 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.08(6H, s), 0.90(9H, s), 2.11(3H, s), 2.44(1H, d), 3.80-3.88(2H, m), 5.41-5.55(1H, m).

実施例 B 1 0 9

4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1,2-ジオール



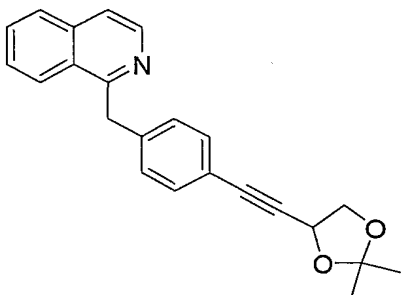
実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 1 0 8 の化合物を用い、実施例 B 4 2 と同様に処理し、カップリング成績体を得た。さらにその成績体を実施例 B 4 7 と同様に水酸基保護基を脱保護し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 3.40-3.45(1H, m), 3.70-3.82(1H, m), 4.30-4.35(1H, m), 4.63(2H, s), 4.90(1H, t), 5.46(1H, d), 7.25-7.30(4H, m), 7.62(1H, dd), 7.71(1H, d), 7.73(1H, dd), 7.94(1H, d), 8.28(1H, d), 8.43(1H, d).

実施例 B 1 1 0

1-{4-[2-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イル)-1-エチニル]ベンジル}イソキノリン

- 1 1 9 -

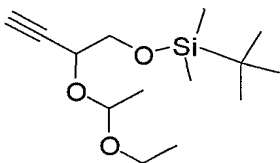


実施例 B 1 0 9 の化合物 34mg のジメチルホルムアミド (2ml) 溶液に、2, 2-ジメトキシプロパン 0.36ml、10-カンファースルホン酸 43mg そしてモレキュラシーブ 4Å を加え、75°C で 9 時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物を 14mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.40(3H, s), 1.50(3H, s), 3.97(1H, dd), 4.21(1H, dd), 4.66(2H, s), 4.91(1H, dd), 7.19(2H, d), 7.32(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.65-7.78(2H, m), 8.08(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 1 1 1

t-ブチル{[2-(1-エトキシエトキシ)-3-ブチニル]オキシ}ジメチルシラン



1-[[1-(t-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ]-3-ブチン-2-オール 1687mg の塩化メチレン (90ml) 溶液に、エチルビニルエーテル 1.21ml とピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩 317mg を加え、室温で 1 時間攪拌した。塩化メチレン層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、表題化合物 1962mg を得た。

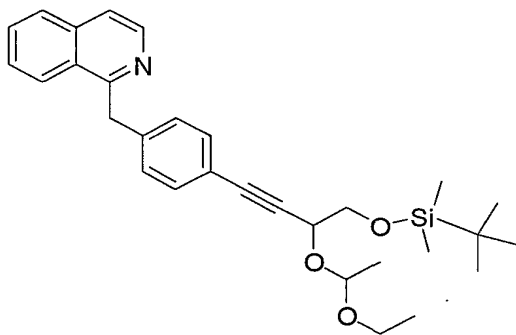
- 1 2 0 -

この化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta (\text{ppm}): 0.00(6\text{H}, \text{s}), 0.81(9\text{H}, \text{s}), 1.01-1.07(3\text{H}, \text{m}), 1.10-1.20(1\text{H}, \text{m}), 1.18(3\text{H}, \text{d}), 3.35-3.63(4\text{H}, \text{m}), 4.18-4.27(1\text{H}, \text{m}), 4.74(0.5\text{H}, \text{q}), 4.81(0.5\text{H}, \text{q}).$

実施例 B 1 1 2

1-{4-[4-{[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}-3-(1-エトキシエトキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン



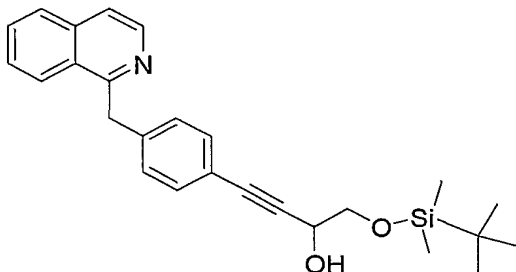
実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 1 1 1 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta (\text{ppm}): 0.00(6\text{H}, \text{s}), 0.80(9\text{H}, \text{s}), 1.01-1.05(3\text{H}, \text{m}), 1.19(3\text{H}, \text{d}), 3.39-3.70(4\text{H}, \text{m}), 4.41(0.5\text{H}, \text{t}), 4.48(0.5\text{H}, \text{t}), 4.59(2\text{H}, \text{s}), 4.79(0.5\text{H}, \text{q}), 4.87(0.5\text{H}, \text{q}), 7.20-7.30(4\text{H}, \text{m}), 7.58(1\text{H}, \text{dd}), 7.68(1\text{H}, \text{d}), 7.69(1\text{H}, \text{dd}), 7.91(1\text{H}, \text{d}), 8.24(1\text{H}, \text{d}), 8.38(1\text{H}, \text{d}).$

実施例 B 1 1 3

1-{[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-2-オール

- 1 2 1 -

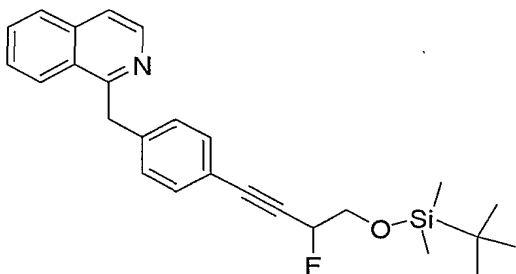


実施例 B 1 1 2 の化合物 474mg のメタノール (15ml) 溶液に、ピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩 486mg を加え、室温で 24 時間攪拌した。反応混合物に酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 265mg を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 0.01 (6H, s), 0.82 (9H, s), 3.55-3.62 (2H, m), 4.30-4.39 (1H, m), 4.61 (2H, s), 5.51 (1H, d), 7.20-7.27 (4H, m), 7.50-7.63 (1H, m), 7.67-7.74 (2H, m), 7.92 (1H, d), 8.27 (1H, d), 8.41 (1H, d).

実施例 B 1 1 4

1-(*t*-ブチル)- 1,1-ジメチルシリル{2-フルオロ-4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチニル}エーテル



窒素雰囲気下、 -78°C に冷却した (ジエチルアミノ) サルファートリフルオリド $44\mu\text{l}$ の塩化メチレン (2ml) 溶液に、実施例 B 1 1 3 の化合物 116mg の塩化メチレン溶液 (2ml) を滴下し、15 分間攪拌後、室温でさらに 8 時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、塩化メ

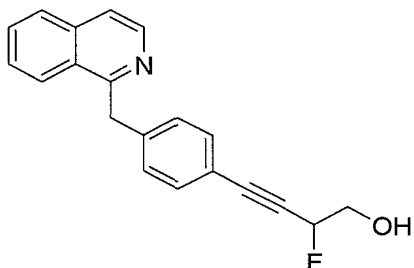
- 1 2 2 -

チレンで抽出した。塩化メチレン層を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物42mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.10(6H, s), 0.91(9H, s), 3.83-4.00(2H, m), 4.67(2H, s), 5.17(1H, ddd), 7.22(2H, d), 7.34(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.08(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 1 1 5

2-フルオロ-4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



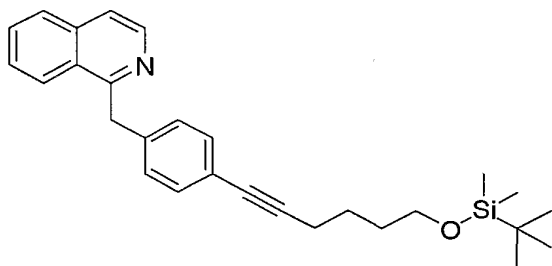
実施例 B 1 1 4 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.31(1H, brs), 3.77-3.95(2H, m), 4.67(2H, s), 5.35(1H, ddd), 7.22(2H, d), 7.35(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.07(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 1 1 6

1-(t-ブチル)- 1,1-ジメチルシリル{6- [4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-5-ヘキシニル}エーテル

- 1 2 3 -

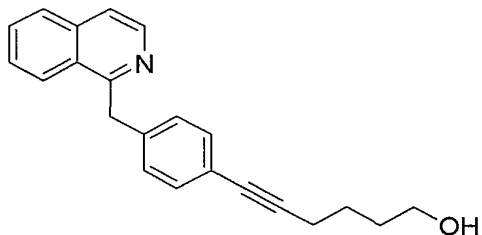


実施例 B 4 1 の化合物と *t*-ブチル(5-ヘキシニルオキシ)ジメチルシランを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.04(6H, s), 0.88(9H, s), 1.55-1.70(4H, m), 2.39(2H, t), 3.64(2H, t), 4.65(2H, s), 7.17(2H, d), 7.27(2H, d), 7.51(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 1 1 7

6-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-5-ヘキシン-1-オール



実施例 B 1 1 6 の化合物実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物を得た。

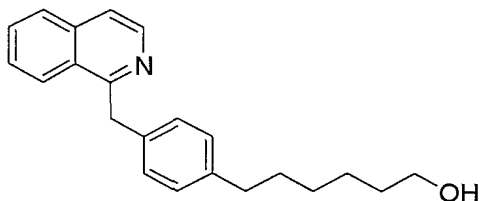
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.60-1.80(4H, m), 2.42(2H, t), 3.69(2H, t), 4.65(2H, s), 7.17(2H, d), 7.27(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.08(1H, d), 8.49(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 1 1 8

6-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ヘキサノール

- 1 2 4 -

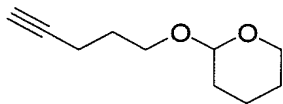


実施例 B 1 1 7 の化合物を実施例 B 4 3 と同様に反応させ、残査はLC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1：99～100：0/20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM, 20mmΦ x 50mm(long)]により分離精製し、表題化合物を得た。

MS m/z (ESI:MH⁺):320.2

実施例 B 1 1 9

2-(4-ペンチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン

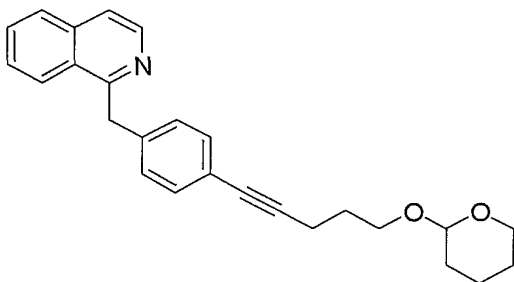


4-ペンチン-1-オールを実施例 B 9 1 と同様に処理し、表題化合物を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm):1.50-1.90(8H, m), 1.95(1H, t), 2.30-2.35(2H, m), 3.46-3.54(2H, m), 3.80-3.90(2H, m), 4.60(1H, dd).

実施例 B 1 2 0

1-{4-[5-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ペンチニル]ベンジル}イソキノリン



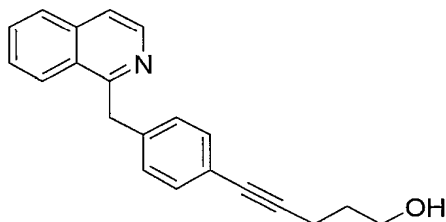
- 1 2 5 -

実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 1 1 9 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.49-1.90(8H, m), 2.49(2H, t), 3.47-3.54(2H, m), 3.82-3.90(2H, m), 4.60(1H, dd), 4.65(2H, s), 7.17(2H, d), 7.27(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 1 2 1

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチン-1-オール



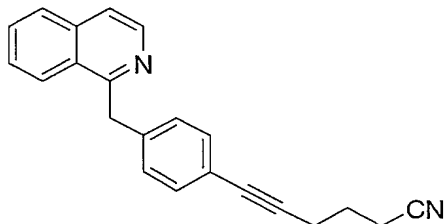
実施例 B 1 2 0 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 1.80-1.88(2H, m), 2.51(2H, t), 3.80(2H, t), 4.65(2H, s), 7.18(2H, d), 7.29(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 1 2 2

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチニルシアニド



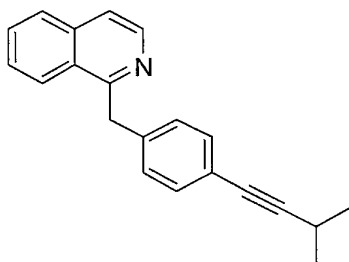
実施例 B 4 1 の化合物と5-シアノ-1-ペンチンを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

- 1 2 6 -

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.85-1.98(2H, m), 2.40-2.60(4H, m), 4.66(2H, s), 7.20(2H, d), 7.28(2H, d), 7.53(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.65(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.09(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 1 2 3

1-[4-(3-メチル-1-ブチニル)ベンジル]イソキノリン

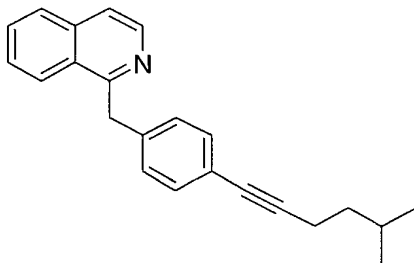


実施例 B 4 1 の化合物と 3-メチル-1-ブチンを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.23(6H, d), 2.70-2.78(1H, m), 4.65(2H, s), 7.18(2H, d), 7.28(2H, d), 7.51(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.08(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 1 2 4

1-[4-(5-メチル-1-ヘキシニル)ベンジル]イソキノリン



実施例 B 4 1 の化合物と 5-メチル-1-ヘキシニルを用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

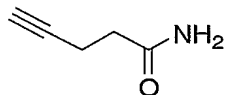
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.91(6H, d), 1.47(2H, dt), 1.68-1.77(1H, m), 2.37(2H, t), 4.65(2H, s), 7.17(2H, d), 7.28(2H, d), 7.52(1

- 1 2 7 -

H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 1 2 5

4-ペンチンアミド

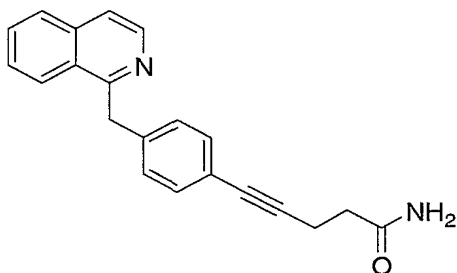


4-ペンチノイック酸2446mgのクロロホルム(75ml)溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン6775mgと炭酸水素アンモニウム5905mgを加え、室温で17.5時間攪拌した。反応混合物をセライトを用いて濾過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物を249mgを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 2.21(2H, t), 2.29-2.33(2H, m), 2.73(1H, t), 6.78-6.88(1H, m), 7.28-7.38(1H, m).

実施例 B 1 2 6

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチンアミド



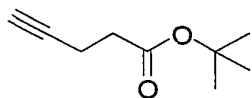
実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 1 2 5 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 2.51(2H, t), 2.85(2H, t), 3.70(2H, br s), 4.59(2H, s), 7.05(2H, d), 7.23(2H, d), 7.61(1H, dd), 7.70(1H, d), 7.72(1H, dd), 7.94(1H, d), 8.30(1H, d), 8.43(1H, d).

実施例 B 1 2 7

- 1 2 8 -

t-ブチル 4-ペンチノエート

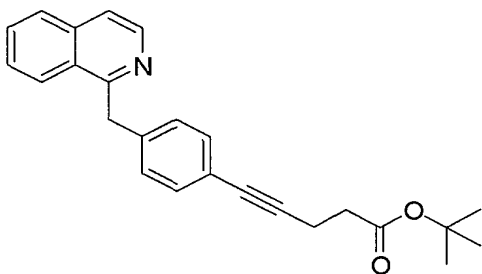


4-ペンチノイックアシッド2550mgの *N,N*-ジメチルアセトアミド(230ml)溶液に、ベンジルトリエチルアンモニウムクロリド5.92g、炭酸カリウム93.4gそしてt-ブチルブロミド143mlを加え、55℃にて24時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、シリカゲルを用いて濾過した。濾液を減圧濃縮し、表題化合物2.10gを得た。この化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.46(9H, s), 1.96-1.97(1H, m), 2.45-2.47(4H, m).

実施例 B 1 2 8

t-ブチル 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチノエート



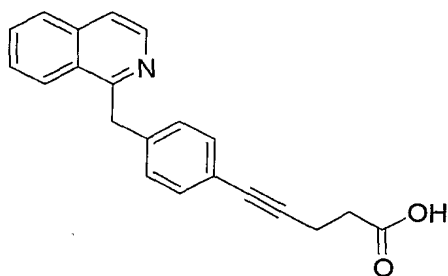
実施例 B 4 1 の化合物と実施例 B 1 2 7 の化合物を用いて、実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.45(9H, s), 2.49(2H, t), 2.64(2H, t), 4.64(2H, s), 7.21(2H, d), 7.26(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.57(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.09(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 1 2 9

5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチノイック酸

- 1 2 9 -



実施例 B 1 2 8 の化合物を実施例 B 6 9 と同様に反応させ、残査は LC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1：99～100：0/20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM, 20mmΦ x 50mm(long)]により分離精製し、表題化合物を得た。

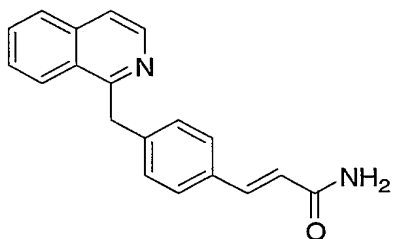
MS m/z (ESI:MH⁺):316.1

以下の実施例の化合物は次の様に合成した。即ち実施例 B 3 3 に従い、実施例 B 4 1 の化合物と以下の各種反応剤を反応させ表題化合物を得た。各種反応剤とはアクリルアミド、*N,N*-ジメチルアクリルアミド、アクリル酸 *t*-ブチルエステル、メチルビニルスルホンである。またその様にし得られたカップリング成績体を実施例 B 3 9 に従い還元するか、または実施例 B 4 0 に従い *t*-ブチルエステルを脱保護するか、またはその両方を行った。精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィーもしくは LC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1：99～100：0/20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM, 20mmΦ x 50mm(long)]により行った。

実施例 B 1 3 0

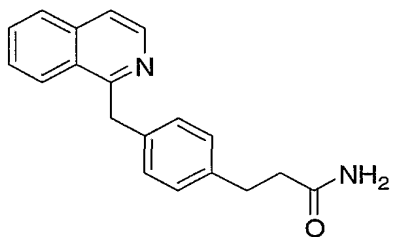
(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペンアミド

- 1 3 0 -

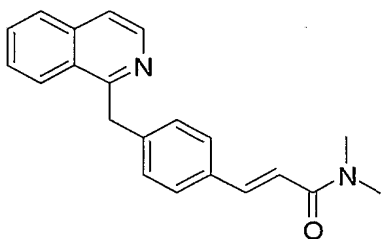
MS m/z (ESI: MH^+): 289.3

実施例 B 1 3 1

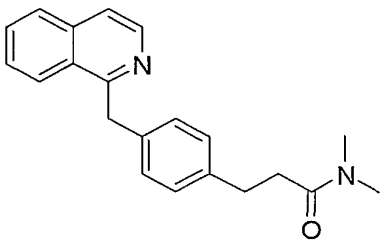
3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロパンアミド

MS m/z (ESI: MH^+): 291.2

実施例 B 1 3 2

N,N-ジメチル-(*E*)- 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペンアミドMS m/z (ESI: MH^+): 317.3

実施例 B 1 3 3

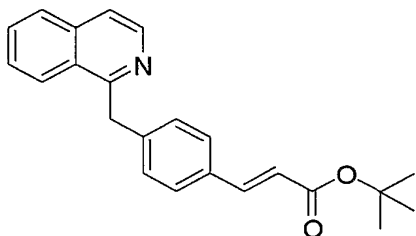
N,N-ジメチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパンアミド

- 1 3 1 -

MS m/z (ESI:MH⁺):319.1

実施例 B 1 3 4

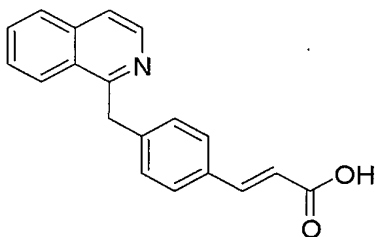
t-ブチル(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノエート



¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.51(9H, s), 4.68(2H, s), 6.28(1H, d), 7.27(2H, d), 7.39(2H, d), 7.49-7.60(3H, m), 7.65(1H, dd), 7.82(1H, d), 8.11(1H, d), 8.50(1H, d).

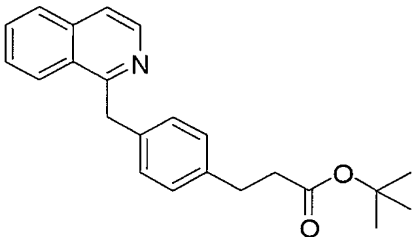
実施例 B 1 3 5

(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノイック酸

MS m/z (ESI:MH⁺):290.2

実施例 B 1 3 6

t-ブチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノエート



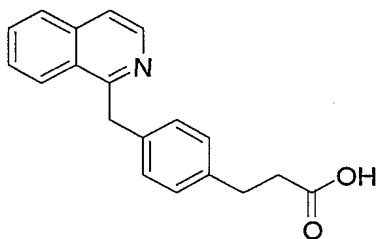
¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37(9H, s), 2.47(2H, t), 2.83(2H, t), 4.64(2H, s), 7.07(2H, d), 7.19(2H, d), 7.52(1H, dd), 7.56(1H, d),

- 1 3 2 -

7.63(1H, dd), 7.81(1H, d), 8.14(1H, d), 8.49(1H, d).

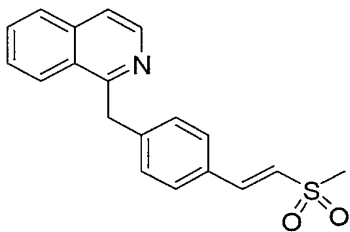
実施例 B 1 3 7

3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノイック酸

MS m/z (ESI:MH⁺):292.1

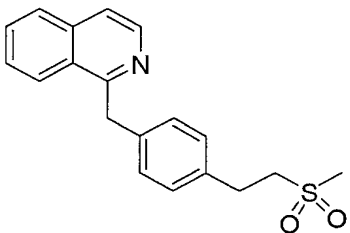
実施例 B 1 3 8

(E)-2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-エテニルメチルスルホン

MS m/z (ESI:MH⁺):324.1

実施例 B 1 3 9

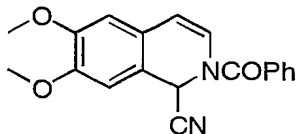
1-{4-[2-(メチルスルホニル)エチル]ベンジル}イソキノリン

MS m/z (ESI:MH⁺):326.1

実施例 B 1 4 0

2-ベンゾイル-6,7-ジメトキシ-1,2-ジヒドロ-1-イソキノリンカルボニトリル

- 1 3 3 -

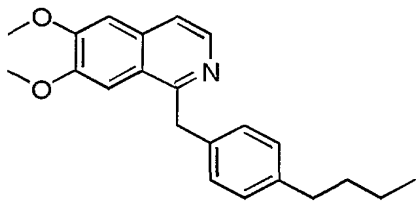


Tetrahedron, 37(23), 3977(1981)に基づいて合成した6,7-ジメトキシイソキノリン1.0g (5.3ミリモル)の塩化メチレン(6.0ml)溶液にシアン化カリウム1.0g (16ミリモル)水溶液(2.3ml)と塩化ベンゾイル1.1 ml (9.5ミリモル)を加え、加熱還流下2時間攪拌した。室温まで戻した後、セライトを用いて濾過を行い、塩化メチレンと水で洗浄した。得られた濾液を分離し、塩化メチレン層を水、2規定塩酸、水そして2規定水酸化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物573mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.92(3H, s), 3.94(3H, s), 5.99(1H, d), 6.51-6.55(2H, m), 6.73(1H, s), 6.85(1H, s), 7.45-7.49(2H, m), 7.53-7.56(1H, m), 7.58-7.61(2H, m)

実施例 B 1 4 1

1-(4-ブチルベンジル)-6,7-ジメトキシイソキノリン



実施例 B 1 4 0 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

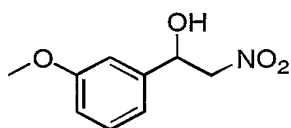
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.51-1.58(2H, m), 2.54(2H, t), 3.88(3H, s), 4.01(3H, s), 4.57(2H, s), 7.05(1H, s), 7.07(2H, d), 7.19(2H, d), 7.32(1H, s), 7.43(1H, d),

- 1 3 4 -

8.37(1H, d)

実施例 B 1 4 2

1-(3-メトキシフェニル)-2-ニトロ-1-エタノール

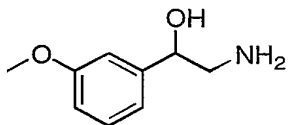


m-アニスアルデヒド5.0g (37ミリモル) とニトロメタン4.0ml (73ミリモル) のメタノール (50ml) 溶液に、水酸化ナトリウム水溶液 (水酸化ナトリウム1.5g (37ミリモル) を水15mlに溶解した。) を、溶液の温度が30℃を越えないように滴下した。その後、室温で4時間攪拌した。氷冷後、酢酸水溶液 (氷酢酸 (37ミリモル) を水250mlに溶解した。) を反応溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を、水と5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物6.09g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.83(3H, s), 4.52(1H, dd), 4.61(1H, dd), 4.76-4.78(1H, m), 5.44-5.48(1H, m), 6.90(1H, dd), 6.96-6.98(2H, m), 7.25-7.34(1H, m)

実施例 B 1 4 3

2-アミノ-1-(3-メトキシフェニル)-1-エタノール



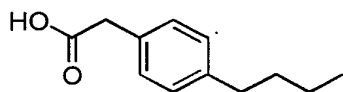
実施例 B 1 4 2 の化合物3.0g (15ミリモル) のテトラヒドロフラン (43ml) とメタノール (43ml) の混合溶液に、パラジウム-炭素 (10%) 0.64gとギ酸アンモニウム4.8gを加え、室温で18時間攪拌した。触媒を濾

- 1 3 5 -

去した後、濾液をエーテルで希釈し析出物を濾去し、得られた濾液を濃縮し、表題化合物を1.82g 得た。この化合物はさらに精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 4 4

2-(4-ブチルフェニル)アセティックアシッド



4-n-ブチルベンジルアルコール9.6g (59ミリモル) のエーテル (120ml) 溶液に塩化チオニル4.7ml (66ミリモル) を滴下し、室温で2時間攪拌した。減圧下、溶媒を除去し、過剰の塩化チオニルをベンゼンで共沸することにより除去した。残渣のジメチルスルフォキサイド (50ml) 溶液に、シアン化ナトリウム86g (1.8モル) とヨウ化n-テトラブチルアンモニウム2.2g (5.9ミリモル) を加え、室温で16時間攪拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を、水と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、n-ブチルフェニルアセトニトリル8.2gを黄色油状物として得た。次に、水58mlに濃硫酸48mlを滴下し、その温度を50℃まで冷却した。その溶液に、上記で得られたn-ブチルフェニルアセトニトリル8.2gを滴下し、加熱還流下16時間攪拌した。室温まで冷却後、析出した結晶をろ取し、水で洗浄した。その結晶を0.1規定の水酸化ナトリウム水溶液 (200ml) に溶解し、Norit5gを加え、還流下2時間攪拌した。セライトを用いてNoritを濾去し、濾液を室温まで冷却後、1規定塩酸を用いて濾液を酸性にすることにより、結晶が析出した。析出した結晶をろ取し、水で洗浄し、結晶を乾燥後、表題化合物3.5gを得た。

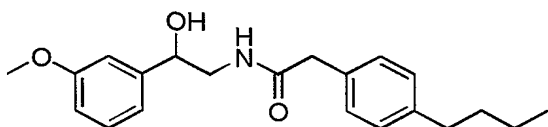
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.93(3H, t), 1.30-1.40(2H, m), 1.53-1.62(2H, m), 2.59(2H, t), 3.62(2H, s), 7.15(2H, d), 7.20(2H, d)

- 1 3 6 -

但し、カルボキシル基のOHはNMRのチャート上は見えていない。

実施例 B 1 4 5

N-[2-ヒドロキシ-2-(3-メトキシフェニル)エチル]-2-(4-ブチルフェニル)アセタミド

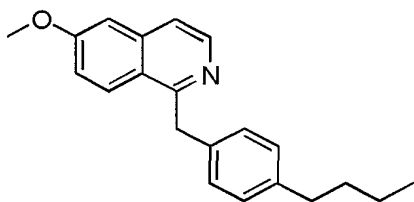


実施例 B 1 4 4 の化合物 1.0g (5.2ミリモル) のベンゼン (10ml) 溶液に、塩化チオニル 0.76ml (10ミリモル) を加え、還流下 2 時間攪拌した。濃縮後、さらにベンゼンと共沸させることにより過剰の塩化チオニルを除去した。得られた残渣と実施例 B 1 4 3 の化合物 0.87g (5.2ミリモル) のエーテル (5ml) 溶液に、水酸化ナトリウム水溶液 (水酸化ナトリウム 0.21g を水 4.2ml に溶解した。) を加え室温で 30 分間激しく攪拌した。エーテル層を分離後、減圧濃縮し、表題化合物 600mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.94(3H, t), 1.31-1.40(2H, m), 1.57-1.63(2H, m), 2.60(2H, m), 3.30-3.37(1H, m), 3.56(2H, s), 3.60-3.66(1H, m), 3.80(3H, s), 3.81(1H, d), 4.79-4.81(1H, m), 6.80-6.89(3H, m), 7.10(2H, d), 7.16(2H, d), 7.20-7.25(1H, m)

実施例 B 1 4 6

1-(4-ブチルベンジル)-6-メトキシイソキノリン



実施例 B 1 4 5 の化合物 600mg (1.7ミリモル) のアセトニトリル (15ml) 溶液に、オキシ塩化リン 1.6ml を加え、還流下 1 時間 30 分間攪拌し

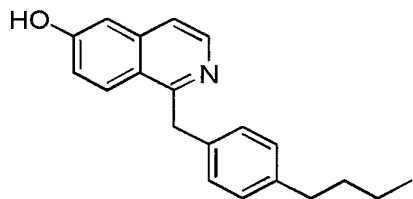
- 1 3 7 -

た。氷冷後、5%炭酸水素ナトリウム水溶液を用いてアルカリ性にした後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物82mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.53(2H, t), 3.92(3H, s), 4.57(2H, s), 7.05-7.07(3H, m), 7.13-7.18(3H, m), 7.45(1H, d), 8.06(1H, d), 8.41(1H, d)

実施例 B 1 4 7

1-(4-ブチルベンジル)-6-イソキノリノール

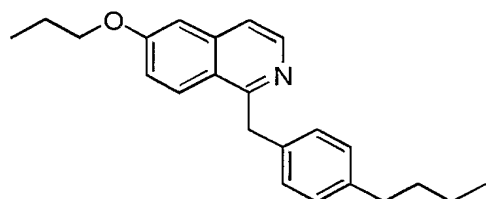


実施例 B 1 4 6 の化合物82mgに47%臭化水素水を加え、還流下19時間攪拌した。減圧濃縮した後、水を加え、炭酸ナトリウムで中和することにより結晶を析出させた。得られた結晶をろ取し、水で洗浄後、結晶を乾燥し、表題化合物74mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.25-1.34(2H, m), 1.49-1.57(2H, m), 2.52(2H, t), 4.63(2H, s), 7.03-7.13(6H, m), 7.49(1H, d), 8.10(1H, d), 8.18(1H, d)

実施例 B 1 4 8

1-(4-ブチルベンジル)-6-プロポキシイソキノリン



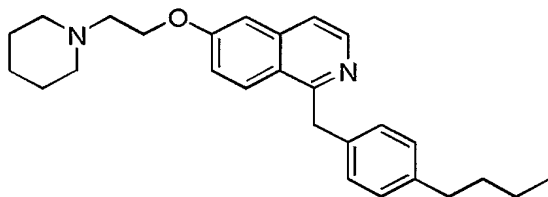
- 1 3 8 -

実施例 B 1 4 7 の化合物 20mg (0.069 ミリモル) と 1-ヨードプロパン 0.4ml (4.1 ミリモル) のトルエン (1.0ml) 溶液に炭酸銀 40mg (0.14 ミリモル) を加え、遮光下 50 °C で 4 時間攪拌した。室温まで冷却後、セライトを用いて濾過し、トルエン-メタノール (9:1) 混合溶液で洗浄した。得られた濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 13mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.08(3H, t), 1.30-1.33(2H, m), 1.51-1.57(2H, m), 1.86-1.91(2H, m), 2.54(2H, t), 4.05(2H, t), 4.58(2H, s), 7.05-7.07(3H, m), 7.14-7.18(3H, m), 7.43-7.44 (1H, m), 8.05-8.07(1H, m), 8.40-8.41(1H, m)

実施例 B 1 4 9

1-(4-ブチルベンジル)-6-(2-ピペリジノエトキシ)イソキノリン



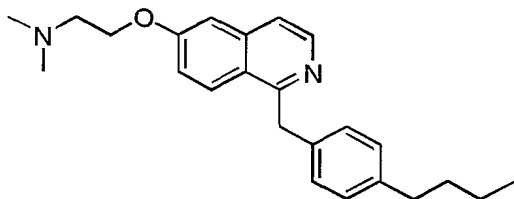
実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.46-1.57 (8H, m), 2.50-2.54(6H, m), 2.83-2.86(2H, m), 4.23(2H, t), 4.56 (2H, s), 7.04-7.06(3H, m), 7.13-7.17(3H, m), 7.43(1H, d), 8.04 (1H, d), 8.40(1H, d)

実施例 B 1 5 0

N-(-{[1-(4-ブチルベンジル)-6-イソキノリル]オキシ}エチル)-*N,N*-ジメチルアミン

- 1 3 9 -

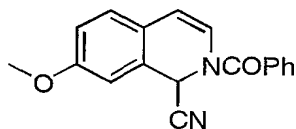


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.49-1.57(2H, m), 2.37(6H, s), 2.52(2H, t), 2.80(2H, t), 4.19(2H, t), 4.57(2H, s), 7.04-7.06(3H, m), 7.15-7.19(3H, m), 7.43(1H, d), 8.05(1H, d), 8.40(1H, d)

実施例 B 1 5 1

2-ベンゾイル-7-メトキシ-1,2-ジヒドロ-1-イソキノリンカルボニトリル

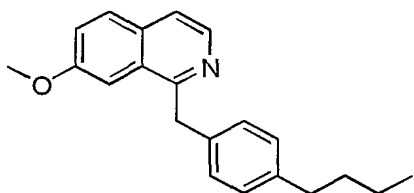


Tetrahedron, 27, 1253 (1971)に基づいて合成した7-メトキシイソキノリンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.87(3H, s), 6.03(1H, brd), 6.56-6.54(2H, m), 6.90(1H, s), 6.95(1H, dd), 7.17(1H, d), 7.46-7.50(2H, m), 7.54-7.62(3H, m)

実施例 B 1 5 2

1-(4-ブチルベンジル)-7-メトキシイソキノリン



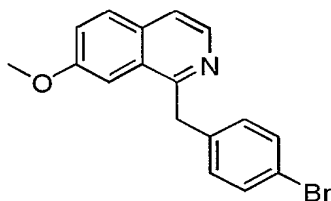
- 1 4 0 -

実施例 B 1 の化合物と実施例 B 1 5 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.56-1.58(2H, m), 2.55(2H, t), 3.82(3H, s), 4.59(2H, s), 7.07(2H, d), 7.20(2H, d), 7.26-7.29(1H, m), 7.35(1H, d), 7.49(1H, d), 7.70(1H, d), 8.38-8.40(1H, m)

実施例 B 1 5 3

1-(4-ブロモベンジル)-7-メトキシイソキノリン

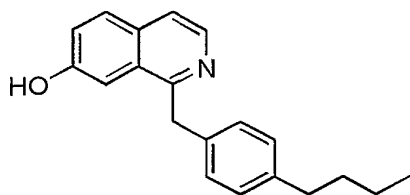


実施例 B 3 1 の化合物と実施例 B 1 5 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.84(3H, s), 4.57(2H, s), 7.14-7.16(2H, m), 7.26(1H, s), 7.29-7.32(1H, m), 7.37-7.39(2H, m), 7.51(1H, d), 7.73(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 5 4

1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリノール



実施例 B 1 5 2 の化合物を実施例 B 1 4 7 と同様にして表題化合物を得た。

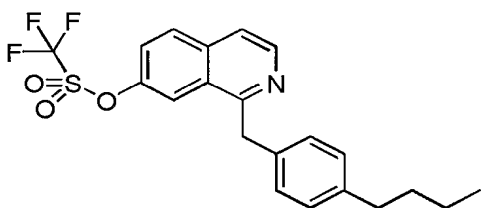
$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6) \delta$ (ppm): 0.83(3H, t), 1.21-1.26(2H, m), 1.44-1.4

- 1 4 1 -

8(2H, m), 4.68(2H, s), 7.11(2H, d), 7.18(2H, d), 7.59-7.62(2H, m), 8.10-8.17(2H, m), 8.38(1H, d), 10.9(1H, brs) (但し、ブチル基のメチレンプロトン 2 個分がDMSOのシグナルに重なっていて見えない。)

実施例 B 1 5 5

1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル トリフルオロメタン sulfonate



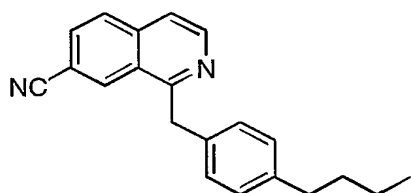
実施例 B 1 5 4 の化合物 1.0g (2.7ミリモル) のジメチルホルムアミド (30ml) 溶液に J. Org. Chem., 64, 7638(1999) に基づいて合成した 4-ニトロフェノールトリフラート 0.72g (2.7ミリモル) と炭酸カリウム 1.1g (8.1ミリモル) を加え、室温で 2 時間攪拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を 1 規定水酸化ナトリウムと飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 1.0g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.27-1.37(2H, m), 1.51-1.59(2H, m), 2.54(2H, t), 5.10(2H, s), 6.38(1H, s), 6.95(2H, d), 7.04(2H, d), 7.44(1H, d), 7.55(1H, d), 7.75(1H, d), 8.45(1H, d)

実施例 B 1 5 6

1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリンカルボニトリル

- 1 4 2 -

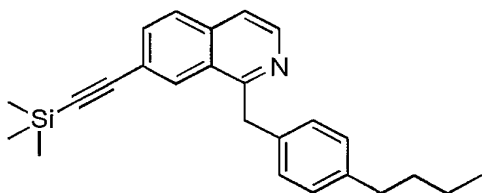


窒素雰囲気下、実施例 B 1 5 5 の化合物 400mg (0.95ミリモル) のジメチルホルムアミド (2ml) 溶液に、シアン化亜鉛 215mg (1.8ミリモル)、テトラキストリフェニルフォスフィンパラジウム 41mg (0.035ミリモル) そして塩化リチウム 120mg (2.8ミリモル) を加え 120℃で2時間攪拌した。室温まで冷却後、飽和炭酸水素ナトリウムを加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 71mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.35(2H, m), 1.47-1.55(2H, m), 2.50(2H, t), 4.91(2H, s), 6.97(2H, d), 7.07(2H, d), 7.28-7.31(1H, m), 7.42(1H, d), 7.51(1H, d), 7.74(1H, d), 8.34(1H, d)

実施例 B 1 5 7

1-(4-ブチルベンジル)-7-[2-(1,1,1-トリメチルシリル)-1-エチニル]イソキノリン



実施例 B 1 5 5 の化合物 100mg (0.24ミリモル) とトリメチルシリルアセチレン 65 μ l (0.47ミリモル) のジメチルホルムアミド (3.0ml) 溶液に、酢酸パラジウム 11mg (0.047ミリモル)、1,1-ビスジフェニルフォス

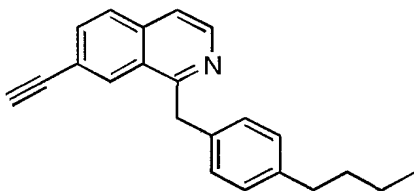
- 1 4 3 -

フィノフェロセン72mg (0.13ミリモル) そして塩化リチウム25mg (0.59ミリモル) を加え窒素置換した。この溶液にトリエチルアミン59 μ l (0.43ミリモル) とヨウ化銅2mg (0.018ミリモル) を加え、80℃で21時間攪拌した。室温まで冷却後、水と酢酸エチルを加え分配した。酢酸エチル層を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物7.0mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.28-0.32(9H, m), 0.92(3H, t), 1.32-1.38(2H, m), 1.54-1.57(2H, m), 2.57(2H, t), 4.63(2H, s), 7.10(2H, d), 7.20(2H, d), 7.52(1H, d), 7.67-7.69(1H, m), 7.75(1H, d), 8.34(1H, d), 8.51(1H, d)

実施例 B 1 5 8

1-(4-ブチルベンジル)-7-(1-エチニル)イソキノリン



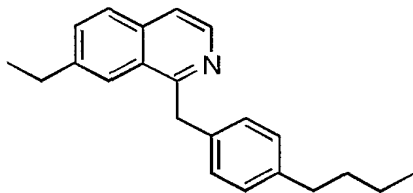
実施例 B 1 5 7 の化合物6mg (0.016ミリモル) のメタノール(1.0ml) 溶液に、炭酸カリウム13mg (0.094ミリモル) を加え室温で1時間攪拌した。減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物3.0mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.29-1.38(2H, m), 1.52-1.57(2H, m), 2.55(2H, t), 3.19(1H, s), 4.62(2H, s), 7.09(2H, d), 7.20(2H, d), 7.53(1H, d), 7.67-7.69(1H, m), 7.77(1H, d), 8.36(1H, s), 8.52(1H, d)

実施例 B 1 5 9

- 1 4 4 -

1-(4-ブチルベンジル)-7-エチルイソキノリン

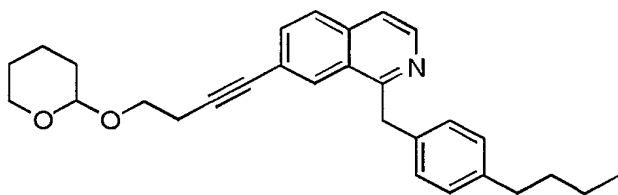


実施例 B 1 5 8 の化合物 2.0mg のテトラヒドロフラン (2.0ml) 溶液に、パラジウム-炭素 5.0mg (10%) を加え、室温で窒素雰囲気下 (1atm) 1 時間攪拌した。触媒を濾去し、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 0.21mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(6H, t), 1.25-1.32(2H, m), 1.48-1.57(2H, m), 2.53(2H, t), 2.80(2H, q), 4.62(2H, s), 7.06(2H, d), 7.20(2H, d), 7.49-7.52(2H, m), 7.73(1H, d), 7.95(1H, s), 8.43(1H, d)

実施例 B 1 6 0

1-(4-ブチルベンジル)-7-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]イソキノリン



実施例 B 1 5 5 の化合物 100mg (0.24ミリモル) と 2-(3-ブチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン 73mg (0.47ミリモル) のジメチルホルムアミド (3.0ml) 溶液に、酢酸パラジウム 11mg (0.047ミリモル)、1,1-ビスジフェニルフォスフィノフェロセン 72mg (0.13ミリモル) そして塩化リチウム 25mg (0.59ミリモル) を加え系内を窒素置換した。さらに、トリエチルアミン 59 μ l (0.43ミリモル) とヨウ化銅 2mg (0.018ミリモル) を

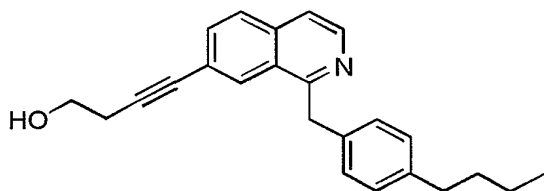
- 1 4 5 -

加え、80℃で24時間撹拌した。室温まで冷却後、水を加え酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物25mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.38(2H, m), 1.52-1.67(6H, m), 1.72-1.79(1H, m), 1.79-1.88(1H, m), 2.54(2H, t), 2.78(2H, t), 3.53-3.56(1H, m), 3.66-3.72(1H, m), 3.91-3.99(2H, m), 4.60(2H, s), 4.71-4.73(1H, m), 7.08(2H, d), 7.19(2H, d), 7.50(1H, d), 7.59-7.62(1H, m), 7.72(1H, d), 8.24(1H, s), 8.48(1H, d)

実施例 B 1 6 1

4-[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]-3-ブチン-1-オール



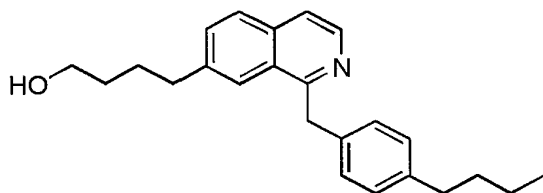
実施例 B 1 6 0 の化合物を実施例 B 2 9 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.39(2H, m), 1.51-1.57(2H, m), 1.83(1H, brs), 2.55(2H, t), 2.75(2H, t), 3.84-3.89(2H, m), 4.60(2H, s), 7.08(2H, d), 7.18(2H, d), 7.50(1H, d), 7.60-7.62(1H, m), 7.73(1H, d), 8.25(1H, s), 8.48(1H, d)

実施例 B 1 6 2

4-[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]-1-ブタノール

- 1 4 6 -

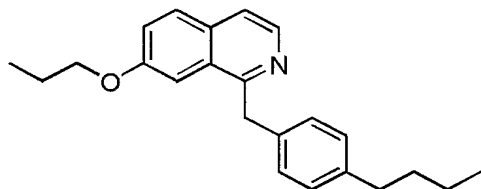


実施例 B 1 6 1 の化合物を実施例 B 3 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.28-1.36(2H, m), 1.50-1.59(4H, m), 1.67-1.77(3H, m), 2.53(2H, t), 2.79(2H, t), 3.63(2H, t), 4.62(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.47-7.52(2H, m), 7.73(1H, d), 7.92(1H, s), 8.43(1H, d)

実施例 B 1 6 3

1-(4-ブチルベンジル)-7-プロポキシイソキノリン



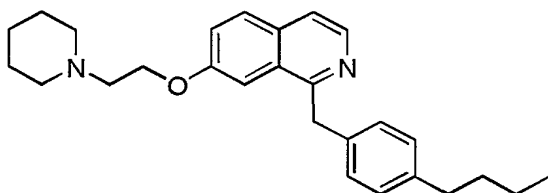
実施例 B 1 5 4 の化合物を実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.05(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.56(2H, m), 1.76-1.84(2H, m), 2.53(2H, t), 3.92(2H, t), 4.58(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.26-7.29(1H, m), 7.34(1H, d), 7.48(1H, d), 7.70(1H, d), 8.38(1H, d)

実施例 B 1 6 4

1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-ピペリジノエトキシ)イソキノリン

- 1 4 7 -

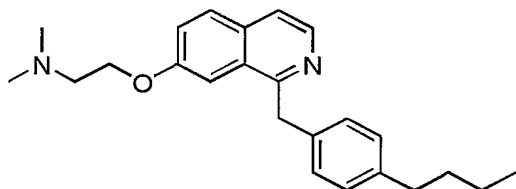


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.43-1.58(4H, m), 1.61-1.69(4H, m), 2.51-2.55(6H, m), 2.79(2H, t), 4.11(2H, t), 4.57(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.28-7.30(1H, m), 7.36(1H, d), 7.48(1H, d), 7.70(1H, d), 8.38(1H, d)

実施例 B 1 6 5

N-(2-{[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]オキシ}エチル)-*N,N*-ジメチルアミン



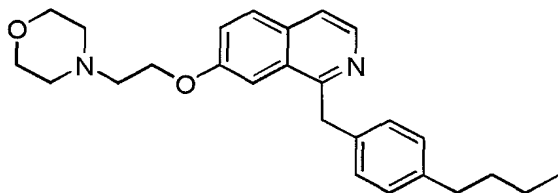
実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.57(2H, m), 2.35(6H, s), 2.53(2H, t), 2.75(2H, t), 4.06(2H, t), 4.58(2H, s), 7.06(2H, d), 7.18(2H, d), 7.30-7.33(1H, m), 7.36(1H, d), 7.48(1H, d), 7.70(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 6 6

1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル(2-モルフォリノエチル)エーテル

- 1 4 8 -

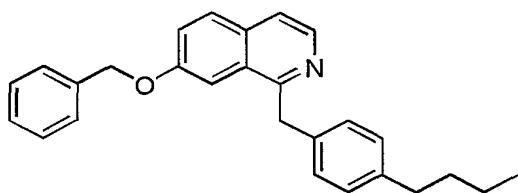


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.51-2.58(6H, m), 2.81(2H, t), 3.75(4H, t), 4.11(2H, t), 4.58(2H, s), 7.06(2H, d), 7.17(2H, d), 7.28-7.31(1H, m), 7.35(1H, d), 7.49(1H, d), 7.71(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 6 7

7-(ベンジルオキシ)-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン

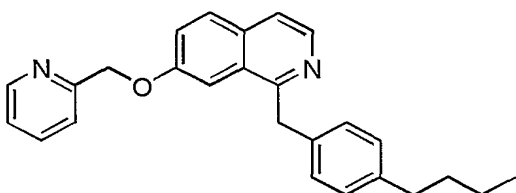


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.54(2H, m), 2.54(2H, t), 4.54(2H, s), 5.06(2H, s), 7.05(2H, d), 7.14(2H, d), 7.34-7.43(7H, m), 7.49(1H, d), 7.72(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 6 8

1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-ピリジルメトキシ)イソキノリン



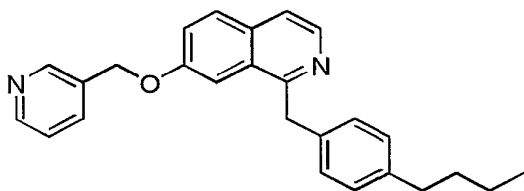
- 1 4 9 -

実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.49-1.57(2H, m), 2.52(2H, t), 4.51(2H, s), 5.25(2H, s), 7.02(2H, d), 7.14(2H, d), 7.24-7.27(1H, m), 7.40(1H, dd), 7.47-7.50(3H, m), 7.68-7.72(1H, d), 7.74(1H, d), 8.39(1H, d), 8.64-8.66(1H, m)

実施例 B 1 6 9

1-(4-ブチルベンジル)-7-(3-ピリジルメトキシ)イソキノリン

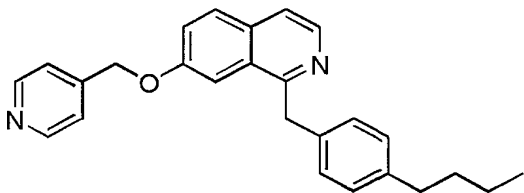


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.54(2H, t), 4.57(2H, s), 5.06(2H, s), 7.07(2H, d), 7.15(2H, d), 7.31-7.36(2H, m), 7.42(1H, d), 7.51(1H, d), 7.74-7.76(2H, m), 8.42(1H, d), 8.61-8.62(1H, m), 8.69-8.70(1H, m)

実施例 B 1 7 0

1-(4-ブチルベンジル)-7-(4-ピリジルメトキシ)イソキノリン



実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

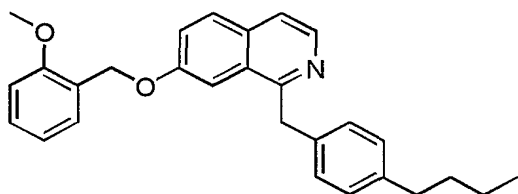
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.56(2H, m), 2.54(2H, t), 4.53(2H, s), 5.09(2H, s), 7.04(2H, d), 7.09(2H, d), 7.33-7.39(4H, m), 7.51(1H, d), 7.76(1H, d), 8.41(1H,

- 1 5 0 -

d), 8.63-8.64(2H, m)

実施例 B 1 7 1

1-(4-ブチルベンジル)-7-[(2-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン

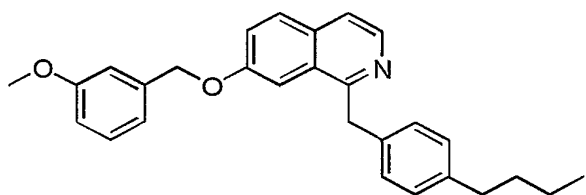


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.57(2H, m), 2.53(2H, t), 3.82(3H, s), 4.52(2H, s), 5.04(2H, s), 6.88-6.91(1H, m), 6.99-7.02(2H, m), 7.05(2H, d), 7.14(2H, d), 7.32(1H, t), 7.36(1H, dd), 7.43(1H, d), 7.48(1H, d), 7.72(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 7 2

1-(4-ブチルベンジル)-7-[(3-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン



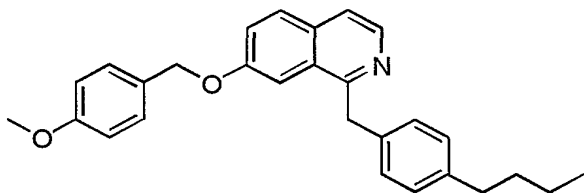
実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.56(2H, m), 2.53(2H, t), 3.90(3H, s), 4.53(2H, s), 5.16(2H, s), 6.93-6.98(2H, m), 7.03(2H, d), 7.15(2H, d), 7.30-7.35(1H, m), 7.37(1H, dd), 7.41-7.43(1H, m), 7.47(1H, d), 7.51(1H, d), 7.71(1H, d), 8.37(1H, d)

実施例 B 1 7 3

- 1 5 1 -

1-(4-ブチルベンジル)-7-[(4-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン

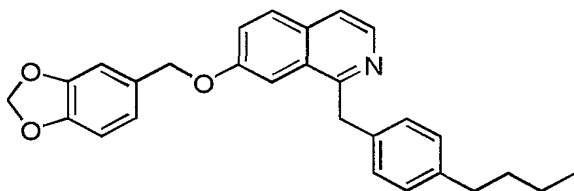


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.37(2H, m), 1.51-1.57(2H, m), 2.54(2H, t), 3.83(3H, s), 4.55(2H, s), 4.99(2H, s), 6.93(2H, d), 7.06(2H, d), 7.15(2H, d), 7.32-7.36(3H, m), 7.44(1H, d), 7.48(1H, d), 7.71(1H, d), 8.38(1H, d)

実施例 B 1 7 4

7-(1,3-ベンゾオキシオール-5-イルメトキシ)-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



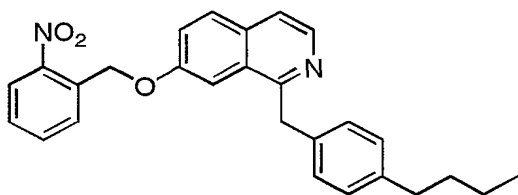
実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.37(2H, m), 1.51-1.57(2H, m), 2.54(2H, t), 4.55(2H, s), 4.95(2H, s), 5.98(2H, s), 6.82(1H, d), 6.88(1H, dd), 6.92(1H, d), 7.06(2H, d), 7.15(2H, d), 7.33(1H, dd), 7.42(1H, d), 7.48(1H, d), 7.72(1H, d), 8.39(1H, d)

実施例 B 1 7 5

1-(4-ブチルベンジル)-7-[(2-ニトロベンジル)オキシ]イソキノリン

- 1 5 2 -

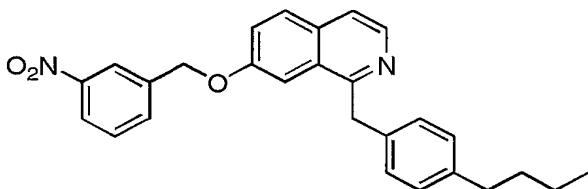


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.87(3H, t), 1.26-1.34(2H, m), 1.48-1.56(2H, m), 2.51(2H, t), 4.53(2H, s), 5.49(2H, s), 7.03(2H, d), 7.14(2H, d), 7.40(1H, dd), 7.430-7.434(1H, m), 7.45-7.49(1H, m), 7.51(1H, d), 7.64-7.68(1H, m), 7.76(1H, d), 7.85-7.87(1H, m), 8.22-8.24(1H, d), 8.41(1H, d)

実施例 B 1 7 6

1-(4-ブチルベンジル)-7-[(3-ニトロベンジル)オキシ]イソキノリン



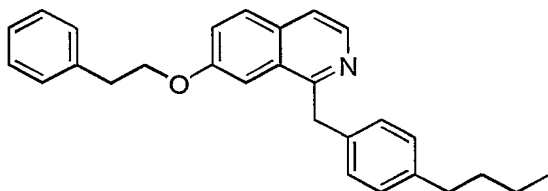
実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.56(2H, m), 2.54(2H, t), 4.55(2H, s), 5.14(2H, s), 7.05(2H, d), 7.11(2H, d), 7.37-7.40(2H, m), 7.51(1H, d), 7.55-7.59(1H, m), 7.73-7.78(2H, m), 8.19-8.22(1H, m), 8.32-8.33(1H, m), 8.42(1H, d)

実施例 B 1 7 7

1-(4-ブチルベンジル)-7-(フェネチルオキシ)イソキノリン

- 1 5 3 -

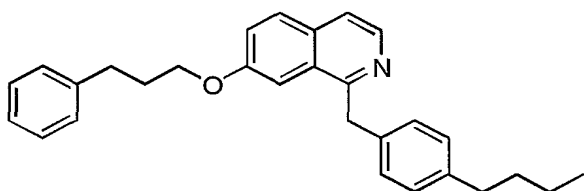


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.49-1.57(2H, m), 2.52(2H, t), 3.10(2H, t), 4.18(2H, t), 4.56(2H, s), 7.04(2H, d), 7.16(2H, d), 7.26-7.28(4H, m), 7.33-7.35(3H, m), 7.48(1H, d), 7.70(1H, d), 8.38-8.39(1H, m)

実施例 B 1 7 8

1-(4-ブチルベンジル)-7-(3-フェニルプロポキシ)イソキノリン

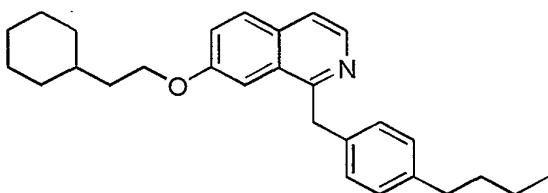


実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.49-1.57(2H, m), 2.09-2.15(2H, m), 2.52(2H, t), 2.82(2H, t), 3.97(2H, t), 4.55(2H, s), 7.04(2H, d), 7.16(2H, d), 7.20-7.23(3H, m), 7.27-7.33(4H, m), 7.48(1H, d), 7.70(1H, d), 8.38(1H, d)

実施例 B 1 7 9

1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-シクロヘキシルエトキシ)イソキノリン



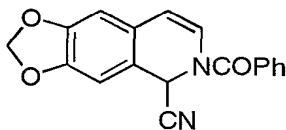
- 1 5 4 -

実施例 B 1 4 8 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 0.94-1.02(2H, m), 1.17-1.36(4H, m), 1.36-1.57(4H, m), 1.65-1.76(7H, m), 2.53(2H, t), 3.98(2H, t), 4.58(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.25-7.28(1H, m), 7.33(1H, d), 7.47(1H, d), 7.69(1H, d), 8.37(1H, d)

実施例 B 1 8 0

6-ベンゾイル-5,6-ジヒドロ[1,3]ジオキソロ[4,5-g]イソキノリン-5-カルボニトリル

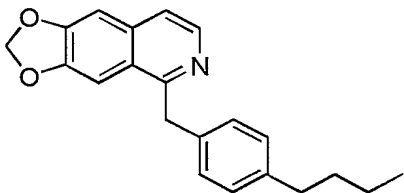


[1,3]ジオキソロ[4,5-g]イソキノリンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 5.94-5.96(1H, m), 6.03(1H, d), 6.04(1H, d), 6.47-6.54(2H, m), 6.70(1H, s), 6.83(1H, s), 7.45-7.49(2H, m), 7.54-7.62(3H, m)

実施例 B 1 8 1

5-(4-ブチルベンジル)[1,3]ジオキソロ[4,5-g]イソキノリン



実施例 B 1 8 0 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

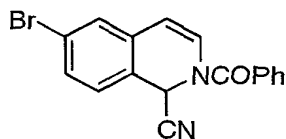
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.37(2H, m), 1.51-1.57(2H, m), 2.54(2H, t), 4.50(2H, s), 6.05(2H, s), 7.05-7.07(3H,

- 1 5 5 -

m), 7.16(2H, d), 7.38(7.40(2H, m), 8.35(1H, d)

実施例 B 1 8 2

2-ベンゾイル-6-ブロモ-1,2-ジヒドロ-1-イソキノリンカルボニトリル

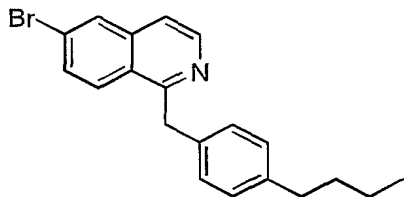


J. Am. Chem. Soc., 183(1942)に基づいて合成した6-ブロモイソキノリンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 6.01(1H, d), 6.53(1H, brs), 6.70(1H, brd), 7.24(1H, d), 7.33(1H, d), 7.47-7.51(3H, m), 7.56(3H, m)

実施例 B 1 8 3

6-ブロモ-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



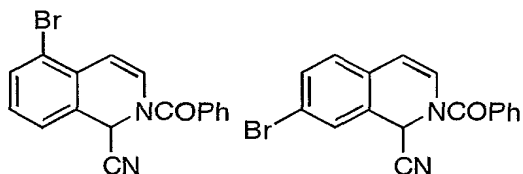
実施例 B 1 8 2 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.36(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.53(2H, t), 4.60(2H, s), 7.06(2H, d), 7.15(2H, d), 7.46(1H, d), 7.59(1H, q), 7.98(1H, d), 8.02(1H, d), 8.51(1H, d)

実施例 B 1 8 4

2-ベンゾイル-5-ブロモ-1,2-ジヒドロ-1-イソキノリンカルボニトリルと2-ベンゾイル-7-ブロモ-1,2-ジヒドロ-1-イソキノリンカルボニトリルの混合物

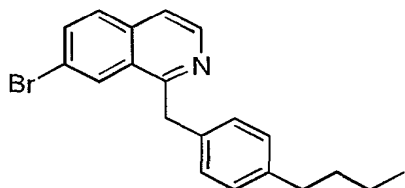
- 1 5 6 -



J. Am. Chem. Soc., 61, 183(1939)に基づいて合成した5-または7-ブロモイソキノリンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。得られた化合物は分離精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 1 8 5

7-ブロモ-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン

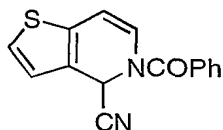


実施例 B 1 8 4 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.37(2H, m), 1.51-1.58(2H, m), 2.55(2H, t), 4.58(2H, s), 7.09(2H, d), 7.18(2H, d), 7.51-7.53(1H, m), 7.69-7.70(2H, m), 8.33-8.34(1H, m), 8.52(1H, d)

実施例 B 1 8 6

5-ベンゾイル-4,5-ジヒドロチエノ[3,2-c]ピリジン-4-カルボニトリル



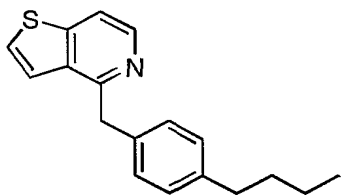
J. Heterocycl. Chem., 30, 183 (1993)に基づいて合成したチエノ[3,2-c]ピリジンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 6.05(1H, d), 6.57(1H, brd), 6.66(1H, s), 7.07(1H, d), 7.32(1H, d), 7.46-7.50(2H, m), 7.54-7.62(3H, m)

- 1 5 7 -

実施例 B 1 8 7

4-(4-ブチルベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

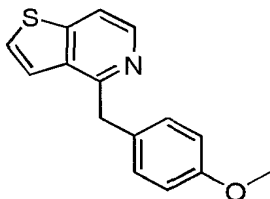


実施例 B 1 8 6 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.27-1.37(2H, m), 1.51-1.59(2H, m), 2.54(2H, t), 4.47(2H, s), 7.07(2H, d), 7.19(2H, d), 7.42(1H, d), 7.47(1H, dd), 7.68(1H, d), 8.41(1H, d)

実施例 B 1 8 8

4-(4-メトキシベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

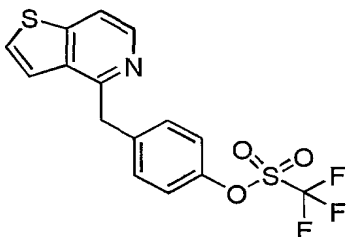


実施例 B 1 8 6 の化合物と4-メトキシベンジルクロリドを実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.75(3H, s), 4.44(2H, s), 6.79-6.82(2H, m), 7.19-7.22(2H, m), 7.43(1H, d), 7.46(1H, dd), 7.68(1H, d), 8.41(1H, d)

実施例 B 1 8 9

4-(チエノ[3,2-c]ピリジン-4-イルメチル)フェニル トリフルオロメタン
ンスルフォネート

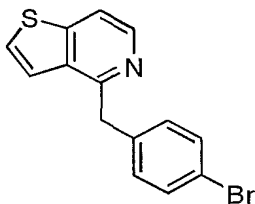


0℃に冷却した実施例B 188の化合物510mg (2.0ミリモル)の塩化メチレン(10ml)溶液に、三臭化ホウ素の塩化メチレン溶液10ml (1.0M, 10ミリモル)を滴下し、その温度で1時間半攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え弱アルカリ性にした後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をピリジンに溶解し、0℃に冷却した後、トリフルオロメタンスルフォニックアンハイドライド0.34ml (2.1ミリモル)を滴下し、その温度で2時間攪拌した。氷水に注ぎ、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、表題化合物312mgを得た。

$$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 4.52(2\text{H}, \text{s}), 7.16-7.18(2\text{H}, \text{m}), 7.36(2\text{H}, \text{m}), 7.43-7.44(1\text{H}, \text{m}), 7.49(1\text{H}, \text{d}), 7.73(1\text{H}, \text{d}), 8.42(1\text{H}, \text{d})$$

实施例 B 190

4-(4-ブロモベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン



実施例 B 1 8 6 の化合物と実施例 B 3 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

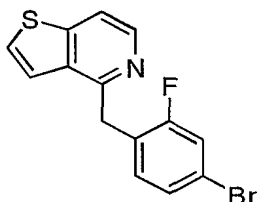
¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 4.45(2H, s), 7.14-7.16(2H, m), 7.37-7.39(2H, m), 7.41-7.43(1H, m), 7.45(1H, d), 7.71(1H, d), 8.41(1H,

- 1 5 9 -

d)

実施例 B 1 9 1

4-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

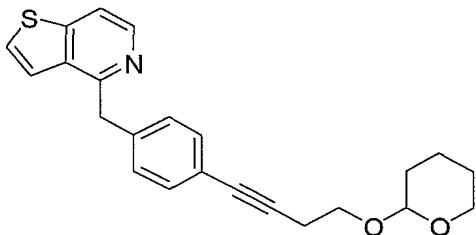


実施例 B 1 8 6 の化合物と 4-ブromo-2-フルオロベンジブロミドを実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm})$: 4.46(2H, s), 7.11(1H, t), 7.15-7.18(1H, m), 7.22-7.25(1H, m), 7.47(1H, d), 7.49(1H, d), 7.71(1H, d), 8.41(1H, d)

実施例 B 1 9 2

4-{4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}チエノ[3,2-c]ピリジン



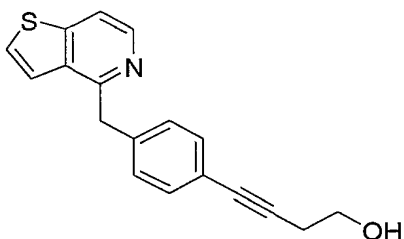
実施例 B 1 8 9 の化合物と 2-(3-ブチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピランを実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm})$: 1.40-1.90(6H, m), 2.69(2H, t), 3.45-3.65(2H, m), 3.78-3.95(2H, m), 4.48(2H, s), 4.66-4.69(1H, m), 7.18(2H, d), 7.27(2H, d), 7.41(1H, d), 7.44(1H, d), 7.70(1H, d), 8.41(1H, d).

実施例 B 1 9 3

- 1 6 0 -

4-[4-(チエノ[3,2-c]ピリジン-4-イルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



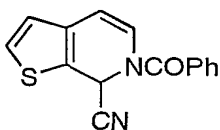
実施例 B 1 9 2 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 2.67(2H, t), 3.79(2H, t), 4.50(2H, s), 7.20(2H, d), 7.32(2H, d), 7.41(1H, d), 7.44(1H, d), 7.71(1H, d), 8.42(1H, d).

水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 1 9 4

6-ベンゾイル-6,7-ジヒドロチエノ[2,3-c]ピリジン-7-カルボニトリル



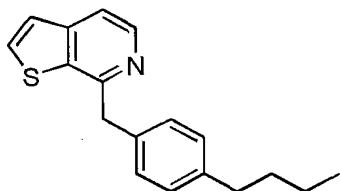
J. Heterocycl. Chem., 30, 183(1993)に基づいて合成したチエノ[2,3-c]ピリジンを実施例 B 1 4 0 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 6.07(1H, d), 6.56(1H, brd), 6.75(1H, s), 6.97(1H, d), 7.37(1H, d), 7.46-7.51(2H, m), 7.54-7.64(3H, m)

実施例 B 1 9 5

7-(4-ブチルベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン

- 1 6 1 -

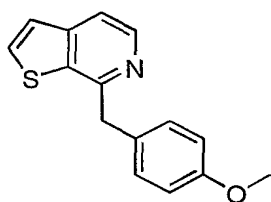


実施例 B 1 9 4 の化合物と実施例 B 1 の化合物を実施例 B 2 と同様に
して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.37(2H, m), 1.51-1.59
(2H, m), 2.55(2H, t), 4.40(2H, s), 7.09(2H, d), 7.28(2H, d), 7.
34(1H, d), 7.57(1H, d), 7.62(1H, d), 8.47(1H, d)

実施例 B 1 9 6

7-(4-メトキシベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン



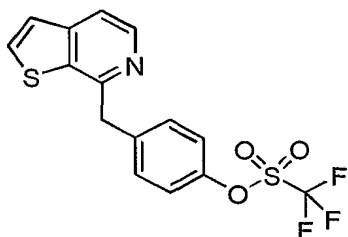
実施例 B 1 9 4 の化合物と4-メトキシベンジルクロリドを実施例 B 2
と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.76(3H, s), 4.38(2H, s), 6.81-6.83(2H,
m), 7.28-7.30(2H, m), 7.35(1H, d), 7.57(1H, d), 7.62(1H, d), 8.
47(1H, d)

実施例 B 1 9 7

4-(チエノ[2,3-c]ピリジン-7-イルメチル)フェニル トリフルオロメタ
ンスルフォネート

- 1 6 2 -

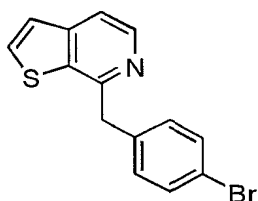


実施例 B 1 9 6 の化合物を実施例 B 1 8 9 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.44(2H, s), 7.17-7.19(2H, m), 7.38-7.40(1H, m), 7.44-7.46(2H, m), 7.61(1H, d), 7.65-7.67(1H, m), 8.47-8.49(1H, m)

実施例 B 1 9 8

7-(4-ブロモベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン

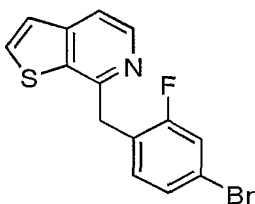


実施例 B 1 9 4 の化合物と実施例 B 3 1 の化合物を実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.37(2H, s), 7.23-7.25(2H, m), 7.37(1H, d), 7.39-7.41(2H, m), 7.59(1H, d), 7.63-7.65(1H, m), 8.47(1H, d)

実施例 B 1 9 9

7-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン



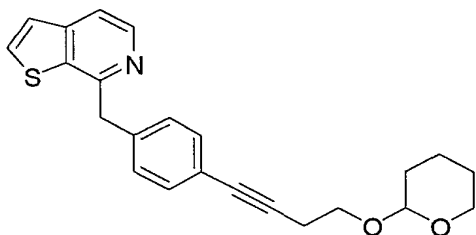
- 1 6 3 -

実施例 B 1 9 4 の化合物と 4-ブromo2-フルオロベンジブロミドを実施例 B 2 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 4.40-4.41(2H, m), 7.12-7.20(2H, m), 7.23-7.26(1H, m), 7.37-7.39(1H, m), 7.59-7.62(1H, m), 7.65-7.67(1H, m), 8.45-8.47(1H, m)

実施例 B 2 0 0

7-{4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}チエノ[2,3-c]ピリジン

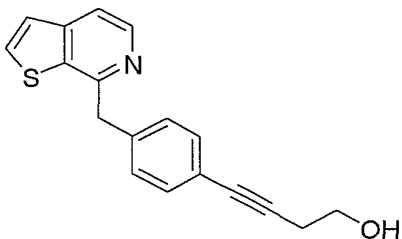


実施例 B 1 9 7 の化合物と 2-(3-ブチニルオキシ)テトラヒドロ-2H-ピランを実施例 B 4 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.50-1.90(6H, m), 2.69(2H, t), 3.49-3.54(1H, m), 3.58-3.65(1H, m), 3.85-3.95(2H, m), 4.41(2H, s), 4.68(1H, t), 7.26-7.31(4H, m), 7.36(1H, d), 7.58(1H, d), 7.63(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 2 0 1

4-[4-(チエノ[2,3-c]ピリジン-7-イルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



実施例 B 2 0 0 の化合物を実施例 B 4 7 と同様に処理し、表題化合物

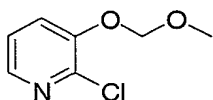
- 1 6 4 -

を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.99(1H, brs), 2.67(2H, t), 3.79(2H, t), 4.42(2H, s), 7.27-7.34(4H, m), 7.36(1H, d), 7.59(1H, d), 7.64(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 2 0 2

2-クロロ-3-(メトキシメトキシ)ピリジン

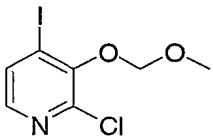


窒素雰囲気下、氷冷した2-クロロ-3-ヒドロキシピリジン2.05g (15.8ミリモル)のテトラヒドロフラン(30ml)溶液に、66%水素化ナトリウム633mg (17.4ミリモル)を加え、その温度で15分間攪拌した。その反応溶液にクロロメチルメチルエーテル1.32ml (17.4ミリモル)を加え、その温度で30分間攪拌後、さらに室温で2時間攪拌した。水を加え、酢酸エチルを用いて抽出し、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物2.44gを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 3.53(3H, s), 5.28(2H, s), 7.19(1H, dd), 7.49(1H, dd), 8.06(1H, dd)

実施例 B 2 0 3

2-クロロ-4-ヨード-3-(メトキシメトキシ)ピリジン



窒素雰囲気下、 -78°C に冷却した1.51M *t*-ブチルリチウム-*n*-ペンタン溶液8.01ml (12.1ミリモル)のジエチルエーテル(15ml)溶液に、実施例 B 2 0 2 の化合物1.40g (8.06ミリモル)のジエチルエーテル8ml溶液を滴下し、その温度で15分間攪拌した。その反応溶液にヨウ素3.07g (12.

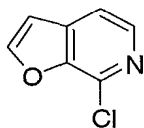
- 1 6 5 -

1ミリモル)を加え、徐々に室温まで昇温させた。チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、ジエチルエーテル層を分配し、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物356mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.73(3H, s), 5.22(2H, s), 7.69(1H, d), 7.80(1H, d)

実施例 B 2 0 4

7-クロロフロ[2,3-c]ピリジン



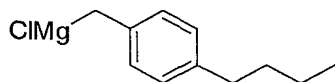
実施例 B 2 0 3 の化合物36.6mg (0.143ミリモル)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム16.5mg (0.0143ミリモル)そしてヨウ化第1銅2.7mg (0.014ミリモル)のジメチルホルムアミド(1.5ml)溶液に、トリメチルシリルアセチレン28.3 μ l(0.201ミリモル)とトリエチルアミン59.8 μ l(0.429ミリモル)を加え、50°Cで4時間攪拌した。室温まで放冷後水を加え、酢酸エチルを用いて抽出し、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣のメタノール(5ml)溶液に、炭酸カリウム100mg(0.724ミリモル)を加え、室温で1時間攪拌した。水を加え、ジエチルエーテルを用いて抽出し、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物5.5mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 6.89(1H, d), 7.51(1H, d), 7.83(1H, d), 8.21(1H, d)

実施例 B 2 0 5

4-ブチルベンジルマグネシウムクロリド

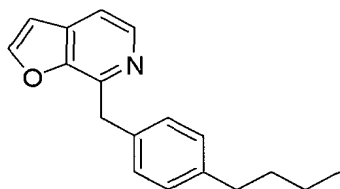
- 1 6 6 -



実施例 B 1 の化合物 1.04g (5.69 ミリモル)、マグネシウム 761mg (31.3 ミリモル)そして触媒量の 1,2-ジブromoエタンのジエチルエーテル(11ml)の混合液を加熱還流によりイニシエーションした後、熱源を除き、さらに実施例 B 1 の化合物 4.16g (22.8 ミリモル)のジエチルエーテル 60ml 溶液を緩やかな還流を保つ速度で滴下し、30 分間加熱還流した。室温まで放冷し表題化合物を 0.4M ジエチルエーテル溶液として得、そのまま次の反応に用いた。

実施例 B 2 0 6

7-(4-ブチルベンジル)フロ[2,3-c]ピリジン



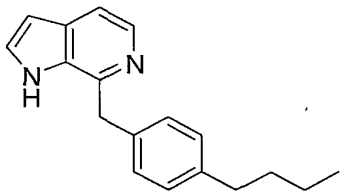
実施例 B 2 0 4 の化合物 5.0mg (0.033 ミリモル)と[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロニッケル(II) 4.5mg (0.0065 ミリモル)のテトラヒドロフラン(1ml)溶液に、実施例 B 2 0 5 の化合物 300 μ l (0.1 ミリモル)を加え、50°C で 1 時間攪拌した。室温まで放冷後、酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液と飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣を NH-シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 2.9mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.29-1.35(2H, m), 1.50-1.58(2H, m), 2.54(2H, t), 4.40(2H, s), 6.78(1H, d), 7.08(2H, d), 7.30(2H, d), 7.40(1H, d), 7.72(1H, d), 8.34(1H, d)

実施例 B 2 0 7

- 1 6 7 -

7-(4-ブチルベンジル)-1H-ピロロ[2,3-c]ピリジン



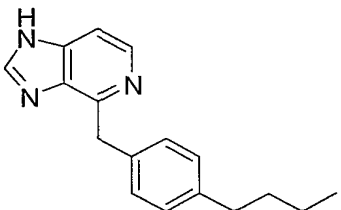
氷冷下、2-クロロ-3-アミノピリジンから特開平7-165708に記載の方法に基づいて合成した1-クロロピロロピリジン19.4mg (0.127ミリモル)とジクロロ(ジフェニルホスフィノプロパン)ニッケル6.9mg(0.013ミリモル)のテトラヒドロフラン(1ml)溶液に、実施例B 2 0 5の化合物800 μ l(0.3ミリモル)を加え、加熱還流下4時間攪拌した。室温まで放冷後、酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液と飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物7.1mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.31-1.37(2H, m), 1.55-1.59(2H, m), 2.58(2H, t), 4.44(2H, s), 6.50(1H, d), 7.12(2H, d), 7.18(1H, d), 7.22(2H, d), 7.45(1H, d), 8.21(1H, d)

NHのプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 2 0 8

4-(4-ブチルベンジル)-1-イミダゾ[4,5-c]ピリジン



4-アミノ-2-クロロピリジンからJ.Heterocycl.chem.,2,196(1965)の文献記載の方法に基づいて合成した1-クロロイミダゾピリジン88.6mg (0.577ミリモル)とジクロロ(ジフェニルホスフィノプロパン)ニッケル31.3

- 1 6 8 -

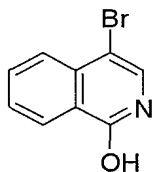
mg (0.0577ミリモル)のテトラヒドロフラン(2ml)溶液に、実施例B 2 0 5の化合物3.45ml(1.38ミリモル)を加え、加熱還流下2時間攪拌した。室温まで放冷後、酢酸エチルを加え、シリカゲルを用いて濾過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物64.2mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.86(3H, t), 1.23-1.32(2H, m), 1.44-1.52(2H, m), 2.47(2H, t), 4.56(2H, s), 7.02(2H, d), 7.19(2H, d), 7.34(1H, d), 8.00(1H, s), 8.25-8.27(1H, m)

NHのプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 2 0 9

4-ブromo-1-イソキノリノール

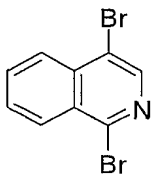


氷冷した1-ヒドロキシイソキノリン5.01g (34.5ミリモル)の酢酸(50 ml)溶液に、臭素1.78ml (34.5ミリモル)を加え、室温で2時間攪拌した。その反応溶液に水、酢酸エチルそしてテトラヒドロフランを加え、濾紙を用いて濾過した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルとヘキサンを用いて再結晶し、表題化合物6.19gを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6)\delta$ (ppm): 7.56(1H, s), 7.59-7.63(1H, m), 7.76-7.78(1H, m), 7.84-7.89(1H, m), 8.23-8.26(1H, m), 11.59(1H, br s)

実施例 B 2 1 0

1,4-ジブromoイソキノリン



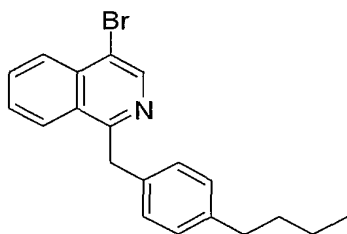
- 1 6 9 -

実施例 B 2 0 9 の化合物 1.40g (8.06ミリモル)と3臭化リン 6mlの混合液を 150℃で 1 時間攪拌した後、さらに 1 時間加熱還流した。室温まで放冷後、その反応溶液を氷に注ぎ、室温まで昇温させた。酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 845mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 7.76-7.80(1H, m), 7.86-7.90(1H, m), 8.19(1H, d), 8.31-8.34(1H, m), 8.48(1H, s)

実施例 B 2 1 1

4-ブロモ-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



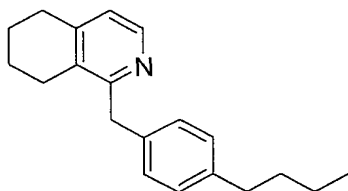
実施例 B 2 1 0 の化合物 200mg (0.697ミリモル)と[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロニッケル(II) 75.6mg (0.139ミリモル)のテトラヒドロフラン(2ml)溶液に、実施例 B 2 0 5 の化合物 2.5ml(1ミリモル)を加え、室温で 30 分間攪拌した。酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 98mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.29-1.34(2H, m), 1.51-1.60(2H, m), 2.53(2H, t), 4.59(2H, s), 7.06(2H, d), 7.16(2H, d), 7.57-7.61(1H, m), 7.73-7.77(1H, m), 8.15-8.19(2H, m), 8.69(1H, s)

実施例 B 2 1 2

1-(4-ブチルベンジル)-5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリン

- 1 7 0 -

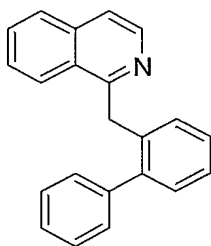


実施例 B 2 1 1 の化合物 13.0mg (0.0367ミリモル)を酢酸エチルとメタノールの混合液(1:1, 1ml)に溶解し、10%パラジウム-炭素(50%含水) 13mgを加え、室温で常圧水素雰囲気下12時間攪拌した。反応系中を窒素置換した後、触媒をセライトを用いて濾去した。得られた濾液を減圧濃縮し、表題化合物 8.8mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.38(2H, m), 1.52-1.59 (2H, m), 1.74-1.82(4H, m), 2.55(2H, t), 2.66(2H, t), 2.81(2H, t), 4.26(2H, s), 7.07-7.15(5H, m), 8.32(1H, d)

実施例 B 2 1 3

1-[2-(フェニル)ベンジル]イソキノリン



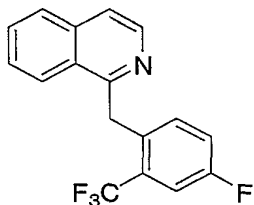
n-ブチルベンジルクロリドの代わりに2-フェニルベンジルブロミドを用いて、実施例 B 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.62(2H, s), 7.05(1H, d), 7.16(1H, dd), 7.22-7.50(8H, m), 7.52(1H, d), 7.58(1H, dd), 7.65(1H, d), 7.76(1H, d), 8.47(1H, d).

実施例 B 2 1 4

1-[4-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル] イソキノリン

- 1 7 1 -

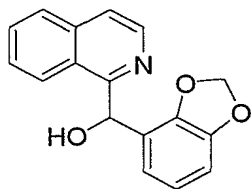


n-ブチルベンジルクロリドの代わりに4-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジルメタンスルホナートを用いて、実施例 B 2 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 4.83(2H, s), 6.87(1H, dd), 7.01(1H, ddd), 7.43(1H, dd), 7.54(1H, dd), 7.61(1H, d), 7.67(1H, dd), 7.85(1H, d), 7.96(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 2 1 5

1,3-ベンゾジオキサイル-4-イル(1-イソキノリル)メタノール



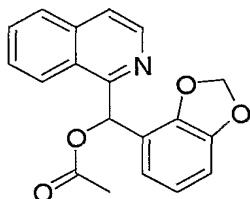
2,3-メチレンジオキシベンズアルデヒドを実施例 B 8 2 と様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 5.97-5.99(1H, m), 6.09(1H, brs), 6.20-6.40(1H, m), 6.54-6.60(2H, m), 6.65-6.70(2H, m), 7.52(1H, dd), 7.63(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.84(1H, d), 8.04(1H, d), 8.53(1H, d).

実施例 B 2 1 6

1,3-ベンゾジオキサイル-4-イル(1-イソキノリル)メチル アセテート

- 1 7 2 -

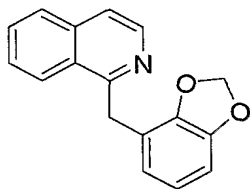


実施例 B 2 1 5 の化合物を実施例 B 3 8 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 2.23(3H, s), 5.98-6.02(2H, m), 6.74-6.79(1H, m), 6.90-6.93(1H, m), 7.15-7.19(1H, m), 7.23-7.28(1H, m), 7.58(1H, dd), 7.60(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.28(1H, d), 8.57(1H, d).

実施例 B 2 1 7

1-(1,3-ベンゾジオキソイル-4-イルメチル)イソキノリン



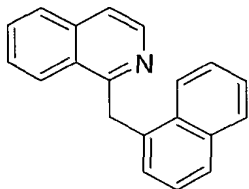
実施例 B 2 1 6 の化合物を実施例 B 3 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 4.62(2H, s), 6.02(2H, s), 6.64-6.70(3H, m), 7.57(1H, dd), 7.58(1H, d), 7.66(1H, dd), 7.83(1H, d), 8.23(1H, d), 8.50(1H, d).

実施例 B 2 1 8

1-(1-ナフチルメチル)イソキノリン

- 1 7 3 -

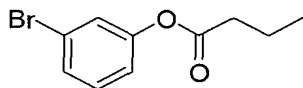


n-ブチルベンジルクロリドの代わりに1-(クロロメチル)ナフタレンを用いて、実施例B2と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 5.13(2H, s), 6.96(1H, d), 7.29(1H, d), 7.45-7.67(5H, m), 7.72(1H, d), 7.84-7.90(2H, m), 8.08(1H, d), 8.26(1H, d), 8.52(1H, d).

実施例B219

3-ブロモフェニルブチレート

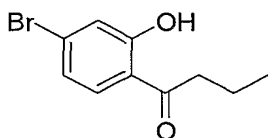


氷冷した3-ブロモフェノール10.0gのピリジン(50ml)溶液に、n-ブチルクロリド7.25mlを加え、その温度で3時間攪拌した後、室温でさらに3.5時間攪拌した。反応混合物に氷を加え、酢酸エチルで抽出し、1規定塩酸と水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し表題化合物12.77gを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.04(3H, t), 1.72-1.82(2H, m), 2.54(2H, t), 7.04(1H, dd), 7.22-7.29(2H, m), 7.36(1H, d).

実施例B220

1-(4-ブロモ-2-ヒドロキシフェニル)-1-ブタノン



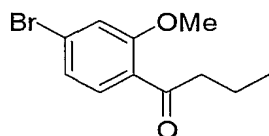
- 1 7 4 -

窒素雰囲気下、実施例 B 2 1 9 の化合物 12.77g のクロロベンゼン (70ml) 溶液に塩化アルミニウム 10.51g を加え、加熱還流下 9 時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、水を加え酢酸エチルで抽出し、水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。この化合物はさらに精製することなく次反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 0.91(3\text{H}, \text{t}), 1.53-1.65(2\text{H}, \text{m}), 3.00(2\text{H}, \text{t}), 7.02(1\text{H}, \text{dd}), 7.19(1\text{H}, \text{d}), 7.78(1\text{H}, \text{d}), 12.50(1\text{H}, \text{s}).$

実施例 B 2 2 1

1-(4-ブロモ-2-メトキシフェニル)-1-ブタノン

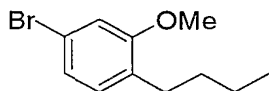


実施例 B 2 2 0 の化合物 13.30g のアセトン (75ml) 溶液に、炭酸カリウム 9.07g とヨウ化メチル 3.92ml を加え、加熱還流下 4 時間撹拌した。反応混合物をセライトを用いて濾過し、エーテルを加え不溶物を濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 9.52g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 0.95(3\text{H}, \text{t}), 1.64-1.74(2\text{H}, \text{m}), 2.91(2\text{H}, \text{t}), 3.90(3\text{H}, \text{s}), 7.10(1\text{H}, \text{d}), 7.14(1\text{H}, \text{dd}), 7.54(1\text{H}, \text{d}).$

実施例 B 2 2 2

4-ブロモ-1-ブチル-2-メトキシベンゼン



実施例 B 2 2 1 の化合物を実施例 B 3 と同様に還元し、表題化合物を得た。

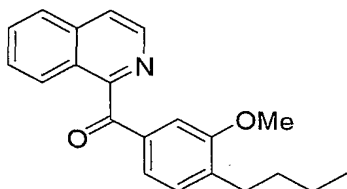
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 0.92(3\text{H}, \text{t}), 1.29-1.39(2\text{H}, \text{m}), 1.48-1.56$

- 1 7 5 -

(2H, m), 2.54(2H, t), 3.81(3H, s), 6.95(1H, s), 6.96-7.02(2H, m).

実施例 B 2 2 3

(4-ブチル-3-メトキシフェニル)(1-イソキノリル)ケトン

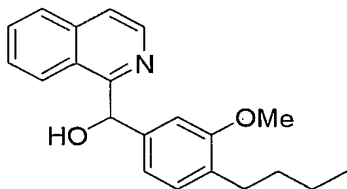


実施例 B 2 2 2 の化合物を実施例 B 3 6 と同様に処理し、表題化合物を含む混合物として得た。

この混合物は分離精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 2 2 4

(4-ブチル-3-メトキシフェニル)(1-イソキノリル)メタノール

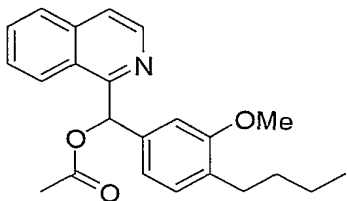


実施例 B 2 2 3 の化合物を実施例 B 3 7 と同様に処理し、表題化合物を含む混合物として得た。

この混合物は分離精製することなく次の反応に用いた。

実施例 B 2 2 5

(4-ブチル-3-メトキシフェニル)(1-イソキノリル)メチル アセテート



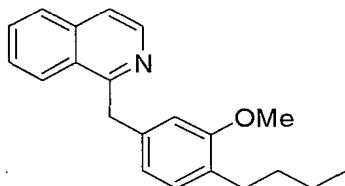
- 1 7 6 -

実施例 B 2 2 4 の化合物を実施例 B 3 8 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.24-1.38(2H, m), 1.46-1.60(2H, m), 2.24(3H, s), 2.54(2H, t), 3.76(3H, s), 6.97(1H, s), 6.98(1H, d), 7.06(1H, d), 7.53-7.67(4H, m), 7.83(1H, d), 8.26(1H, d), 8.58(1H, d).

実施例 B 2 2 6

1-(4-ブチル-3-メトキシベンジル)イソキノリン

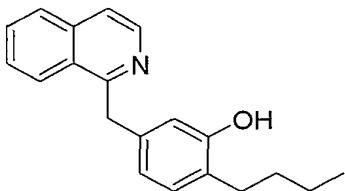


実施例 B 2 2 5 の化合物を実施例 B 3 9 と同様に処理し、表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.27-1.38(2H, t), 1.45-1.54(2H, t), 2.52(2H, t), 3.72(3H, s), 4.63(2H, s), 6.78(1H, d), 6.79(1H, s), 6.99(1H, d), 7.53(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.64(1H, dd), 7.80(1H, d), 8.19(1H, d), 8.49(1H, d).

実施例 B 2 2 7

2-ブチル-5-(1-イソキノリルメチル)フェノール



実施例 B 2 2 6 の化合物を実施例 B 4 0 と同様に処理し、表題化合物を得た。

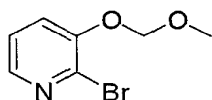
- 1 7 7 -

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.30-1.40(2H, m), 1.52-1.65(2H, m), 2.55(2H, t), 4.55(2H, s), 6.46(1H, brs), 6.85(1H, d), 7.03(1H, d), 7.32-7.40(1H, m), 7.55(1H, dd), 7.68(1H, dd), 7.81(1H, d), 7.94-8.05(1H, m), 8.14(1H, d).

フェノール性水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 2 2 8

2-ブロモ-3-(メトキシメトキシ)ピリジン

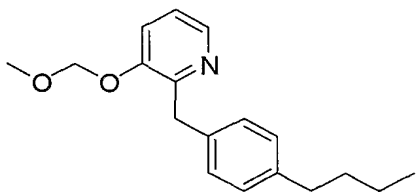


2-ブロモ-3-ヒドロキシピリジンを用い、実施例 B 2 0 2 と同様に合成した。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.53(3H, s), 5.29(2H, s), 7.19-7.23(1H, m), 7.42-7.45(1H, m), 8.04-8.06(1H, m)

実施例 B 2 2 9

2-(4-ブチルベンジル)-3-(メトキシメトキシ)ピリジン



氷冷した実施例 B 2 2 8 の化合物 524mg (2.40ミリモル)とジクロロ(ジフェニルホスフィノプロパン)ニッケル 65.0mg (0.120ミリモル)のテトラヒドロフラン(10ml)混合溶液に、実施例 B 2 0 5 の化合物 7ml(3ミリモル)を加え、加熱還流下5時間攪拌した。室温まで放冷後、酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をNH-シリカゲルを用

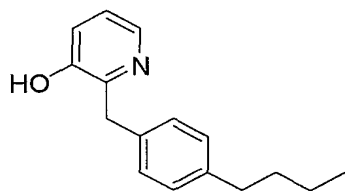
- 1 7 8 -

いて濾過した。減圧濃縮した後、残渣をメタノール(15ml)に溶解し、トリエチルアミン500 μ l(3.59ミリモル)と10%パラジウム-炭素(50%含水)50mgを加え、室温で常圧水素雰囲気下3時間攪拌した。反応系中を窒素置換した後、セライトを用いて触媒を濾去し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物280mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.28-1.34(2H, m), 1.52-1.58(2H, m), 2.53(2H, t), 3.33(3H, s), 4.16(2H, s), 5.16(2H, s), 7.04-7.10(3H, m), 7.20(2H, d), 7.33-7.35(1H, m), 8.19-8.20(1H, m)

実施例 B 2 3 0

2-(4-ブチルベンジル)-3-ピリジノール



実施例 B 2 2 9 の化合物256mg (0.849ミリモル)の塩化メチレン(5ml)溶液に、トリフルオロ酢酸1mlを加え、室温で終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物182mgを得た。

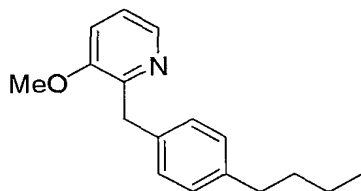
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.28-1.37(2H, m), 1.51-1.58(2H, m), 2.54(2H, t), 4.20(2H, s), 7.02-7.08(4H, m), 7.22(2H, d), 8.08-8.09(1H, m)

フェノール性水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 2 3 1

2-(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン

- 1 7 9 -

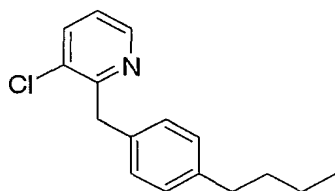


実施例 B 2 3 0 の化合物 19.2mg (0.0796ミリモル)のアセトン(1ml)溶液に、炭酸カリウム 33.0mg (0.239ミリモル)とヨウ化メチル 14.9 μ l (0.239ミリモル)を加え、室温で3時間攪拌した。その反応溶液に酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 1.47mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.32-1.34(2H, m), 1.53-1.57(2H, m), 2.54(2H, t), 3.82(3H, s), 4.14(2H, s), 7.06(2H, d), 7.10-7.11(2H, m), 7.21(2H, d), 8.12-8.14(1H, m)

実施例 B 2 3 2

2-(4-ブチルベンジル)-3-クロロピリジン



氷冷した2,3-ジクロロピリジン 525mg (3.55ミリモル)とジクロロ(ジフェニルホスフィノプロパン)ニッケル 96.2mg (0.178ミリモル)のテトラヒドロフラン(4ml)混合液に、実施例 B 2 0 5 の化合物 12ml(5ミリモル)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 199mgを得た。

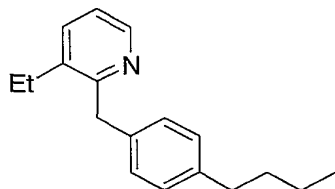
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.29-1.38(2H, m), 1.52-1.60

- 1 8 0 -

(2H, m), 2.56(2H, t), 4.28(2H, s), 7.08-7.13(3H, m), 7.21(2H, d), 7.64(1H, dd), 8.46(1H, dd)

実施例 B 2 3 3

2-(4-ブチルベンジル)-3-エチルピリジン

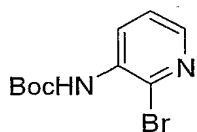


実施例 B 2 3 2 の化合物 12.9mg (0.0496ミリモル)とジクロロ(ジフェニルホスフィノフェロセン)ニッケル 3.4mg (0.0050ミリモル)のテトラヒドロフラン(1ml)混合液に、0.97Mエチルマグネシウムクロリド 102 μ l(0.993ミリモル)を加え、50°Cで1時間攪拌し、さらに2時間加熱還流した。室温まで放冷後、その反応溶液に酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニア水溶液と飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 3.29mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.90-0.93(6H, m), 1.30-1.37(2H, m), 1.54-1.59(2H, m), 2.55-2.59(4H, m), 4.12(2H, s), 7.05-7.18(5H, m), 7.55-7.59(1H, m), 8.53-8.55(1H, m)

実施例 B 2 3 4

tert-ブチル *N*-(2-ブロモ-3-ピリジル)カルバメート



氷冷した3-アミノピリジン 3.97g (42.2ミリモル)のジメチルホルムアミド(25ml)混合液に、*N*-ブロモコハク酸イミド 7.51g(42.2ミリモル)を加え、その温度で30分間攪拌した。その反応溶液に酢酸エチルを加え、

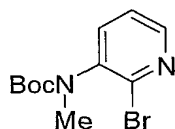
- 1 8 1 -

飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣の塩化メチレン(20ml)溶液を氷冷した後、トリエチルアミン3.74ml(26.8ミリモル)、触媒量のジメチルアミノピリジンそしてジ-*t*-ブチルジカーボネート3.08ml(13.4ミリモル)を加え、室温で終夜攪拌した。減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物344mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.55(9H, s), 7.03(1H, brs), 7.25(1H, dd), 8.03(1H, dd), 8.46(1H, d)

実施例 B 2 3 5

2-ブロモ-3-(*N*-*t*-ブトキシカルボニル-*N*-メチル)アミノピリジン

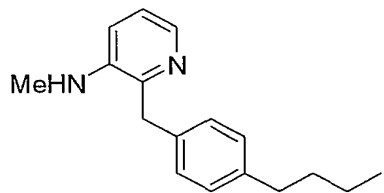


氷冷した実施例 B 2 3 4 の化合物344mg (1.26ミリモル)のジメチルホルムアミド(5ml)溶液に、ヨウ化メチル157 μ l(2.52ミリモル)と66%水素化ナトリウム91.6mg (2.52ミリモル)を加え、その温度で40分間攪拌した。その反応溶液に酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、シリカゲルを用いて濾過した。有機層を減圧濃縮し、表題化合物356mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 1.36(9H, s), 3.17(3H, s), 7.30(1H, dd), 7.55(1H, d), 8.30(1H, dd)

実施例 B 2 3 6

N-[2-(4-ブチルベンジル)-3-ピリジル]-*N*-メチルアミン



実施例 B 2 3 5 の化合物62.8mg (0.219ミリモル)を用い、実施例 B 2

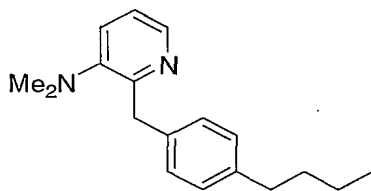
- 1 8 2 -

1 1 と同様にして4-ブチルベンジル基を導入することにより得られた化合物の塩化メチレン(2ml)溶液に、トリフルオロ酢酸2mlを加え、室温で1時間攪拌した。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下し、酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物29.7mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.29-1.38(2H, m), 1.53-1.60(2H, m), 2.56(2H, t), 2.72(3H, s), 3.63(1H, br s), 4.09(2H, s), 6.86(1H, d), 7.08-7.12(5H, m), 7.98(1H, dd)

実施例 B 2 3 7

N-[2-(4-ブチルベンジル)-3ピリジル]-*N,N*-ジメチルアミン



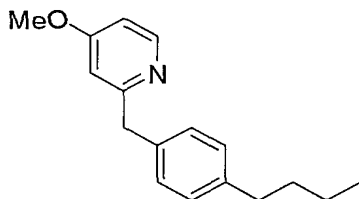
氷冷した実施例 B 2 3 6 の化合物26.8mg (0.105ミリモル)の塩化メチレン(2ml)溶液に、酢酸12.1 μ l(0.211ミリモル)、37%ホルマリン15.8 μ l(0.211ミリモル)そしてトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム44.7mg (0.211ミリモル)を加え、室温で30分間攪拌した。酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物23.3mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.30-1.36(2H, m), 1.52-1.59(2H, m), 2.55(2H, t), 2.67(6H, s), 4.24(2H, s), 7.06(2H, d), 7.10(1H, dd), 7.18(2H, d), 7.40(1H, dd), 8.27(1H, dd)

実施例 B 2 3 8

2-(4-ブチルベンジル)-4-メトキシピリジン

- 183 -

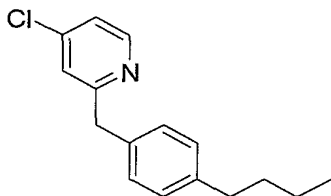


2-クロロ-4-メトキシピリジンを用い、実施例 B 2 1 1 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.91(3H, t), 1.31-1.37(2H, m), 1.53-1.59(2H, m), 2.57(2H, t), 3.78(3H, s), 4.06(2H, s), 6.61-6.65(2H, m), 7.11(2H, d), 7.17(2H, d), 8.36(1H, d)

実施例 B 2 3 9

2-(4-ブチルベンジル)-4-クロロピリジン



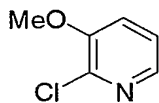
氷冷した実施例 B 2 3 8 の化合物 52.0mg (0.204ミリモル) のジメチルホルムアミド (1ml) 溶液に、オキシ塩化リン 57.0 μl (0.612ミリモル) を加え、100°C で 8 時間攪拌した。放冷後、その反応溶液を氷に注ぎ、室温まで昇温した後、酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 2.29mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.92(3H, t), 1.31-1.38(2H, m), 1.53-1.61(2H, m), 2.59(2H, t), 4.10(2H, s), 7.12-.18(6H, m), 8.44(1H, d)

実施例 B 2 4 0

2-クロロ-3-メトキシピリジン

- 1 8 4 -

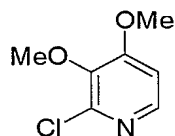


2-クロロ-3-ヒドロキシピリジンをを用い、実施例 B 2 3 1 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 3.93(3\text{H}, \text{s}), 7.21-7.22(2\text{H}, \text{m}), 7.99-8.01(1\text{H}, \text{m})$

実施例 B 2 4 1

2-クロロ-3,4-ジメトキシピリジン



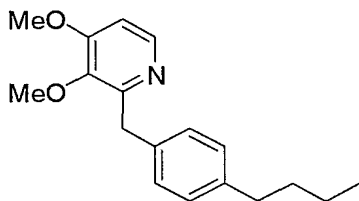
窒素雰囲気下、 -78°C に冷却した1.06Mフェニルリチウム シクロペンタン-ジエチルエーテル溶液のテトラヒドロフラン(11ml)溶液に、ジイソプロピルアミン84.0 μl (0.599ミリモル)と実施例 B 2 4 0 の化合物860mg (5.99ミリモル)のテトラヒドロフラン4ml溶液を加え、 -40°C で1時間攪拌した後、さらに -18°C で20分間攪拌した。その反応溶液を -78°C に再冷却した後、トリメトキシボレート2.04ml(18.0ミリモル)を滴下し、 0°C で20分間攪拌した。その温度で29%アンモニア水溶液30ml、塩化アンモニウム4.5gそして30%過酸化水素水12mlを順次加え、室温で2時間攪拌した。飽和チオ硫酸ナトリウム、酢酸そして酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄した。そしてシリカゲルを用いて濾過して得られた酢酸エチル層を、減圧濃縮した。残渣を用い、実施例 B 2 3 1 と同様にして表題化合物31.3mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 3.89(3\text{H}, \text{s}), 3.94(3\text{H}, \text{s}), 6.82(1\text{H}, \text{d}), 8.05(1\text{H}, \text{d})$

実施例 B 2 4 2

- 185 -

2-(4-ブチルベンジル)-3,4-ジメトキシピリジン

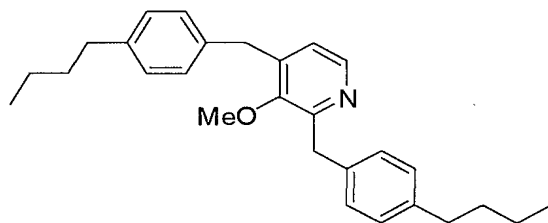


実施例 B 2 4 1 の化合物を用い、実施例 B 2 0 6 と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.90(3H, t), 1.26-1.35(2H, m), 1.53-1.57(2H, m), 2.54(2H, t), 3.70(3H, s), 3.89(3H, s), 4.12(2H, s), 6.72(1H, d), 7.06(2H, d), 7.21(2H, d), 8.20(1H, d)

実施例 B 2 4 3

2,4-ジ(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン



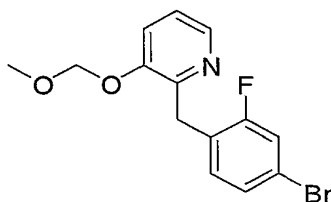
窒素雰囲気下、 -78°C に冷却した1.43M *t*-ブチルリチウム*n*-ペンタン溶液2.76ml(3.95ミリモル)のジエチルエーテル(5ml)溶液に、実施例 B 2 4 0 の化合物436mg (3.04ミリモル)のジエチルエーテル(2ml)溶液を加え、その温度で30分間攪拌した。その反応溶液にテトラメチルエチレンジアミン688 μl (4.56ミリモル)とヘキサクロロエタン719mg(3.04ミリモル)のジエチルエーテル3ml溶液を加え、その温度でさらに1時間攪拌した。徐々に室温まで昇温した後、酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄した。そしてシリカゲルを用いて濾過して得られた酢酸エチル層を減圧濃縮した。残渣を用い、実施例 B 2 0 6 と同様にして表題化合物10.1mgを得た。

- 1 8 6 -

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 0.89-0.94(6H, m), 1.31-1.37(4H, m), 1.52-1.62(4H, m), 2.53-2.59(4H, m), 3.74(3H, s), 4.07(2H, s), 4.13(2H, s), 6.84(1H, d), 6.98(1H, d), 7.04-7.22(8H, m)

実施例 B 2 4 4

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(メトキシメトキシ)ピリジン



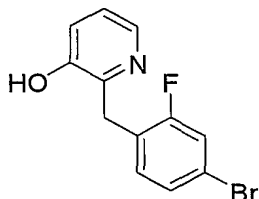
窒素雰囲気下、 -78°C に冷却した2.47M n-ブチルリチウムn-ヘキサン溶液862 μl (2.13ミリモル)のテトラヒドロフラン(3ml)溶液に、実施例 B 2 2 8 の化合物422mg (1.94ミリモル)のテトラヒドロフラン(3ml)溶液を加え、その温度で1時間攪拌した。その反応溶液に臭化第1銅139mg(0.968ミリモル)を加え、 0°C で1時間攪拌した後、 -78°C に再冷却し、4-ブロモ-2-フルオロベンジルブロミド259mg(0.968ミリモル)を加え、 0°C で1時間攪拌した。その溶液にテトラメチルエチレンジアミン584 μl (3.88ミリモル)を加え、その温度でさらに1時間攪拌した。反応液にジエチルエーテルとアンモニア水溶液を加え、有機層を飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物81.0mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.38(3H, s), 4.17(2H, s), 5.18(2H, s), 7.04(1H, t), 7.11-7.22(3H, m), 7.38(1H, dd), 8.19(1H, dd)

実施例 B 2 4 5

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-ピリジノール

- 1 8 7 -



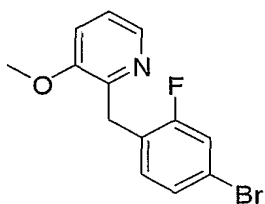
実施例 B 2 4 4 の化合物 134mg (0.411ミリモル)の塩化メチレン(4ml)にトリフルオロ酢酸1mlを加え、室温で終夜攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて中和後、酢酸エチルを加え、酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し表題化合物 97.5mgを得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 4.17(2H, s), 7.10-7.24(5H, m), 8.15(1H, t)

フェノール性水酸基のプロトンは、NMRのチャート上観測されていない。

実施例 B 2 4 6

2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-メトキシピリジン



実施例 B 2 4 5 の化合物 15.8mg (0.0560ミリモル)のジメチルホルムアミド(1ml)溶液に、炭酸カリウム 38.7mg (0.280ミリモル)とヨウ化メチル 10.5 μ l (0.168ミリモル)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 14.0mgを得た。

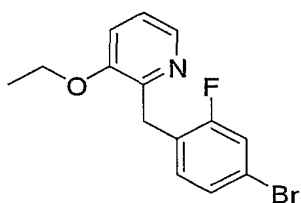
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ (ppm): 3.82(3H, s), 4.15(2H, s), 7.03(1H, t), 7.12-7.22(4H, m), 8.13(1H, dd)

- 1 8 8 -

以下の実施例 B 化合物は、実施例 B 2 4 6 と同様に合成し、精製は LC-MS[溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液=1:99~100:0/ 20分サイクル、流速：20ml/分、カラム：YMC Combiprep ODS-AM、20mmΦ x50mm(Long)]により行った。

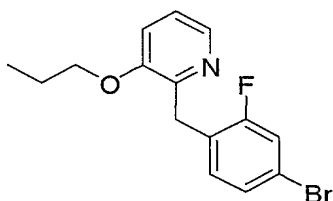
実施例 B 2 4 7

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-エトキシピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 310.0

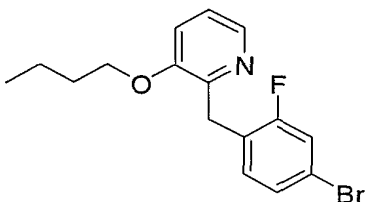
実施例 B 2 4 8

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-プロポキシピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 324.0

実施例 B 2 4 9

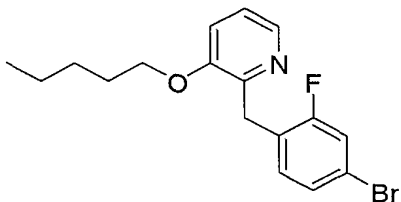
2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-ブトキシピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 338.1

実施例 B 2 5 0

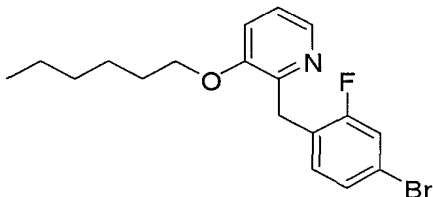
- 1 8 9 -

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(ペンチルオキシ)ピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 352.1

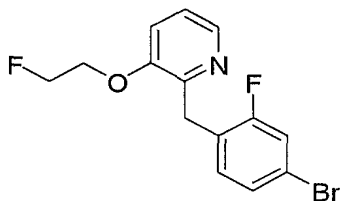
実施例 B 2 5 1

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(ヘキシルオキシ)ピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 366.0

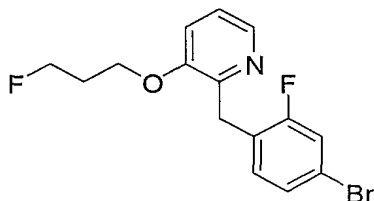
実施例 B 2 5 2

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(2-フルオロエトキシ)ピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 328.0

実施例 B 2 5 3

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(3-フルオロプロポキシ)ピリジン

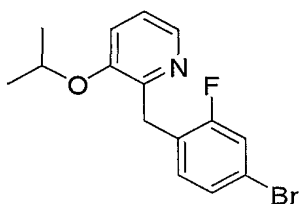


- 1 9 0 -

MS m/z (ESI: MH^+): 342.0

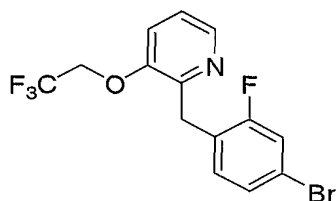
実施例 B 2 5 4

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-イソプロポキシピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 324.0

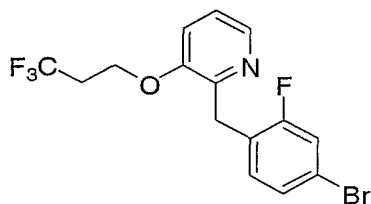
実施例 B 2 5 5

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(2,2,2-トリフルオロエトキシ)ピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 364.0

実施例 B 2 5 6

2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(3,3,3-トリフルオロプロポキシ)ピリジン

MS m/z (ESI: MH^+): 378.0

実施例 B 2 5 7

〔実施例 A 2〕に記載した *S. cerevisiae* レポーター系を用いて化合

- 1 9 1 -

物を評価した。細胞壁画分のセファロスポリナーゼ活性が化合物無処理時の50%以下になる最小濃度をIC50値とした。代表的な化合物の効果を表1に示す。

表 1

化合物	IC50 (μg/ml)
1-(4-ブチルベンジル) イソキノリン (実施例 B 2)	0.39
N1-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル] -2-プロピニル}アセトアミド (実施例 B 6 0)	6.25
N1-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル] プロピル}- N1-メチルアセトアミド (実施例 B 7 3)	50
5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール (実施例 B 8 5)	0.20
4-(4-ブチルベンジル)チエノ [3,2-c]ピリジン (実施例 B 1 8 7)	0.78
7-(4-ブチルベンジル)チエノ [2,3-c]ピリジン (実施例 B 1 9 5)	0.39
2-(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン (実施例 B 2 3 1)	0.78
2-(4-ブチルベンジル)-3,4-ジメトキシピリジン (実施例 B 2 4 2)	0.78

産業上の利用の可能性

本発明は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に関与する蛋白質をコードする遺伝子を明らかにした。更に本発明は、該蛋白質の活性を阻害する化合物のスクリーニング法も開示し、該阻害活性を持つ代表的な化合物をも開示するものである。

本発明は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するという、新規メカニズムの抗真菌剤が可能であることを、新規化合物をもって示した。

- 1 9 2 -

請求の範囲

1. 真菌における過剰発現により、真菌に対し下記式（I a）で示される化合物に対する耐性を付与する作用を有する蛋白質をコードする、下記（a）から（e）のいずれかに記載のDNA。

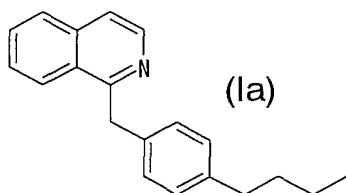
（a）配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

（b）配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列を含むDNA。

（c）配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

（d）配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

（e）配列番号：29及び31あるいは配列番号：29及び30をプライマーとして増幅されるDNA。



2. その機能の欠損により真菌の細胞壁におけるGPIアンカー蛋白質量を減少させる作用を有する蛋白質をコードする、下記（a）から（e）のいずれかに記載のDNA。

- 1 9 3 -

(a) 配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列を含むDNA。

(c) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(d) 配列番号：2、4、6、28、40または59に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(e) 配列番号：29及び31あるいは配列番号：29及び30をプライマーとして増幅されるDNA。

3. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質。

4. 請求項1または2に記載のDNAが挿入されたベクター。

5. 請求項1または2に記載のDNAまたは請求項4に記載のベクターを保持する形質転換体。

6. 請求項3に記載の蛋白質が過剰発現している真菌である、請求項5に記載の形質転換体。

7. 請求項3に記載の蛋白質の機能が欠損している真菌

8. 請求項5に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、請求項3に記載の蛋白質の製造方法。

9. 請求項3に記載の蛋白質に結合する抗体。

10. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項3に記載の蛋白質に被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質と被検試料との結合活性を検出する工程、

- 1 9 4 -

(c) 該蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

11. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項3に記載の蛋白質が過剰発現している真菌に被検試料を接触させる工程、

(b) 該真菌におけるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量を検出する工程、

(c) 請求項3に記載の蛋白質が過剰発現していない真菌に被検試料を接触させた場合と比較して、工程(b)において検出されるGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送量を減少させる化合物を選択する工程、を含む方法。

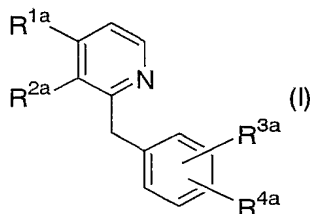
12. 請求項10または11に記載のスクリーニングにより単離する、抗真菌作用を有する化合物。

13. 真菌においてGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送を阻害する化合物を有効成分とする抗真菌剤。

14. 請求項9に記載の抗体または請求項12に記載の化合物を有効成分とする、抗真菌剤。

15.

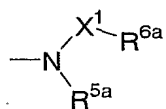
一般式(I)



[式中R^{1a}およびR^{2a}は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されてもよいC₁₋₆アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C

- 1 9 5 -

$_{2-6}$ アルキニル基、置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基、または式

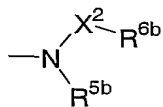


(式中 X^1 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5a} および R^{6a} は同一または相異なって、水素原子、または置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1a} と R^{2a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環、および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環の形成してもよい；

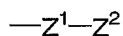
R^{3a} 、および R^{4a} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、または C_{1-6} アルキル基を意味する)、式 $-CO_2R^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_nR^{7a}$ (式中、 n は0ないし2の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式

- 1 9 6 -



(式中 X^2 は単結合、カルボニル基、または式 $-\text{S}(\text{O})_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5b} および R^{6b} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、または置換されていてもよい C_{6-14} アリール基を意味する) で表わされる基、または式

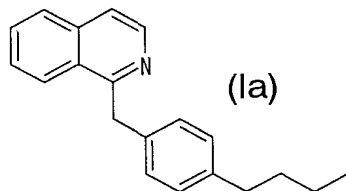


(式中、 Z^1 は単結合、酸素原子、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

Z^2 は単結合、または0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。 R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または1,2-エチレンジオキシ基を意味してもよく、また R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環の形成を意味してもよい。ただし、 R^{1a} および R^{2a} がともに水素原子を意味する場合は除く。) で示される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物を有効成分とする請求項13に記載の抗真菌剤。

- 1 9 7 -

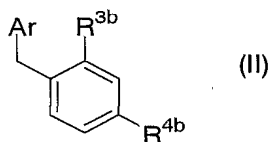
16. 式



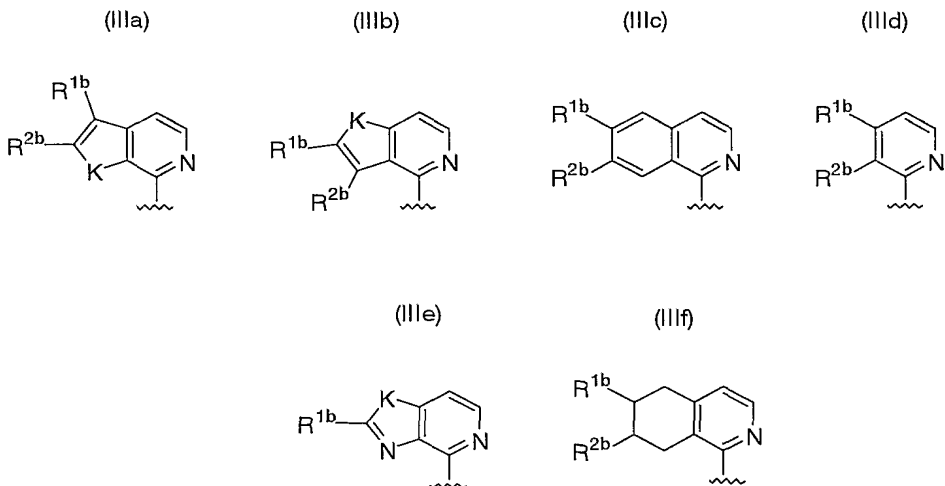
で表される化合物 (Ia) を有効成分とする請求項 13 に記載の抗真菌剤。

17.

一般式 (II)



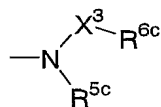
〔式中Arは下記式 (IIIa) - (IIIf) からなる群



(式中、Kは硫黄原子、酸素原子、または式 -NH- で表わされる基を意味する；

R^{1b}、R^{2b}は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、式

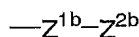
- 1 9 8 -



(式中 X^3 は単結合、カルボニル基、または式 $-\text{S}(0)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5c} および R^{6c} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する)で表わされる基、または式 $-\text{X}^4-\text{R}^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する)で表わされる基を示す。また、 R^{1b} 、 R^{2b} は一緒になってメチレンジオキシ基、または1,2-エチレンジオキシ基を形成してもよい。)から選ばれる置換基を意味する；

R^{3b} 、および R^{4b} は同一または相異なっていてそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、または式、



(式中、 Z^{1b} は単結合、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する； Z^{2b} は単結合、または0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する)で表わされる基を意味する。；

ただし(1) Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子である前記式 (IIIId)

で表わされる場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、

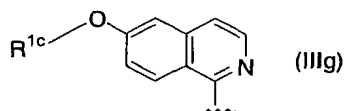
(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水

- 1 9 9 -

素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、Arが、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する前記式(IIIc)で表わされる場合、または(4)Arが、 R^{1b} が水素原子で R^{2b} がホルミル基、ヒドロキシメチル基またはメトキシカルボニル基である前記式(IIIId)で表わされる場合を除く。)で示される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

18.

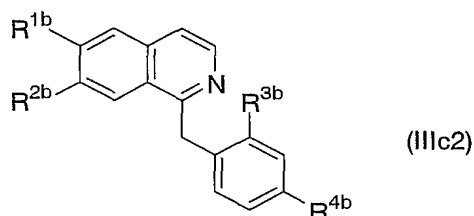
Arが式、



(式中、 R^{1c} が水素原子、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、ベンジル基を意味する)で表わされ、かつ R^{3b} が水素原子を意味する場合を除いた、請求項17記載の化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

19.

一般式(IIIc2)



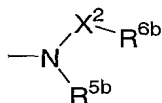
〔式中 R^{1b} 、 R^{2b} は前記定義と同意義を意味する。ただし、(1) R^{1b} が式 $R^{1c}-O-$ (式中、 R^{1c} は前記定義と同意義を意味する)で表わされる基であり、 R^{2b} が水素原子であり、 R^{3b} が水素原子を意味する場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する場合、または

- 2 0 0 -

(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する場合を除く。)で表される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物

20. 抗真菌作用を有する請求項17記載の抗真菌剤

21. R^{3a} 、および R^{4a} のうち少なくとも1つが、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-CO_2R^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_nR^{7a}$ (式中、 n は0ないし2の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式



(式中 X^2 、 R^{5b} および R^{6b} は前記定義と同意義を意味する)で表わされる基、またはは0ないし4個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基を意味し、または R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または1,2-エチレンジオキシ基を意味する請求項15記載の抗真菌剤。

22. 抗真菌作用を有する化合物が、(1)1-ベンジルイソキノリン、(2)1-(4-ブロモベンジル)イソキノリン、(3)1-(4-クロロベンジル)イソキノリン、(4)1-(4-フルオロベンジル)イソキノリン、(5)1-(4-ヨードベンジル)イソキノリン、(6)1-(3-メチルベンジル)イソキノリン、(7)1-(4-メチルベンジル)イソキノリン、(8)1-(3,4-ジメチルベンジル)イソキノリン、(9)1-(3-メトキシベンジル)イソキノリン、(10)1-(4-メトキシベンジル)イソキノリン、(11)1-(3,4-メチレンジオキシベンジル)イソキノリン、(12)1-(4-ベンジルオキシベンジル)イソキノリン、(13)1-(4-シアノベンジル)イソキノリン、

- 2 0 1 -

(14) 1-(4-ニトロベンジル)イソキノリン、(15) 1-(4-アミノベンジル)イソキノリン、(16) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-ジクロロイソキノリン、(17) 1-(4-メトキシ-2-ニトロ-ベンジル)-イソキノリン、(18) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-メチレンジオキシ-イソキノリン、(19) 1-(2-アミノ-4-メトキシ-ベンジル)イソキノリン、(20) 1-(4-メトキシベンジル)-7-ヒドロキシ-6-メトキシ-イソキノリン、(21) 1-(4-ベンジロキシベンジル)-6,7-ジメトキシ-イソキノリン、(22) 1-(4-メトキシベンジル)-6,7-ジメトキシ-イソキノリン、(23) 1-(4-メトキシ-2-ニトロ-ベンジル)-イソキノリン、(24) 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]プロピルシアニド、(25) 1-[4-(2,2,3,3-テトラフルオロプロポキシ)ベンジル]イソキノリン、(26) 1-[4-(2-ピペリジノエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(27) 4-(1-イソキノリルメチル)フェニル(2-モルフォリノエチル)エーテル、(28) 1-[4-(2-メトキシエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(29) *N*-{2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]エチル}-*N,N*-ジメチルアミン、(30) 1-[4-(フェネチロキシ)ベンジル]イソキノリン、(31) 1-{4-[2-メチルアリル)オキシ]ベンジル}イソキノリン、(32) 1-(4-イソブトキシベンジル)イソキノリン、(33) 1-[4-(2-フェノキシエトキシ)ベンジル]イソキノリン、(34) メチル2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]アセテート、(35) 2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-エタノール、(36) *t*-ブチル *N*-{2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]エチル}カーバメート、(37) 1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)プロポキシ]ベンジル}イソキノリン、(38) 2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-エタンアミン、(39) 1-[4-(3-ピペリジノプロポキシ)ベンジル]イソキノリン、(40) 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]-1-プロパノール、(41) 1-[4-(2-

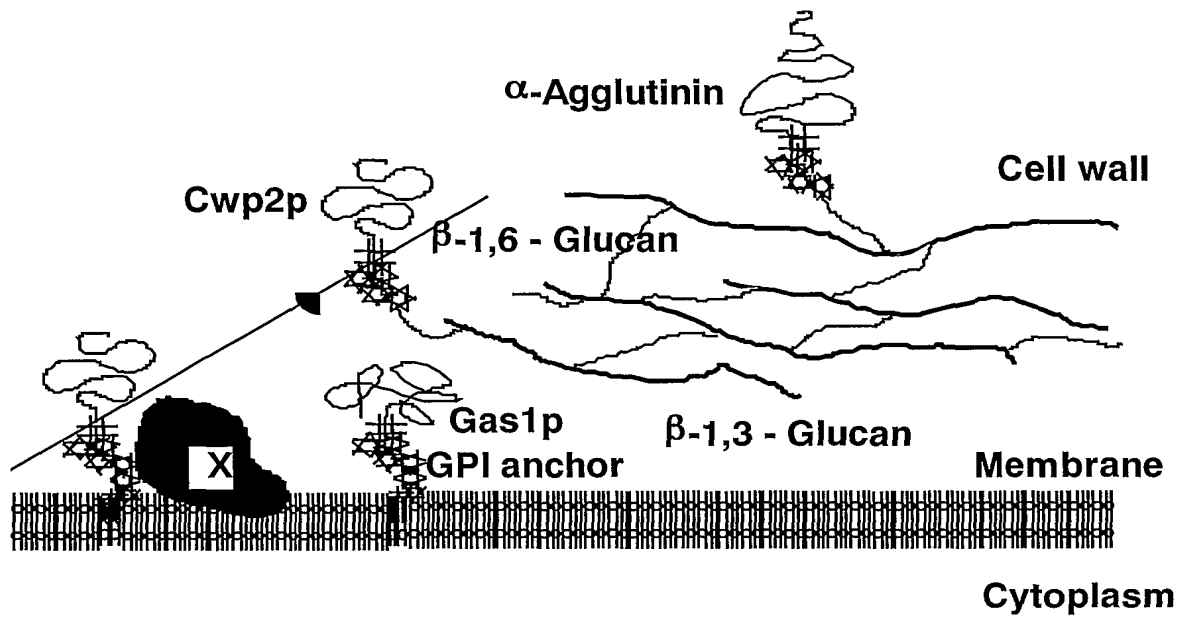
- 2 0 2 -

エチルブトキシ)ベンジル]イソキノリン、(42) 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェノキシ]ブタノイックアシッド、(43) 1-(4-{3-[(4-ベンジルピペラジノ)スルフォニル]プロポキシ}ベンジル)イソキノリン、(44) 1-(4-{3-[4-(4-クロロフェニル)ピペラジノ]プロポキシ}ベンジル)イソキノリン、(45) 4-(1-イソキノリルメチル)アニリン、(46) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]ブタンアミド、(47) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパンアミド、(48) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-エタンスルフォンアミド、(49) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチル-エタンスルフォンアミド、(50) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチルアミン、(51) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-プロピルアミン、または(52) *N*-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-*N*-メチル-*N*-プロピルアミンである請求項15記載の抗真菌剤。

23. 治効量の請求項13から22のいずれかに記載の抗真菌剤を哺乳動物に投与することを含む、真菌感染症の治療方法。

1 / 7

図 1



2 / 7

図 2

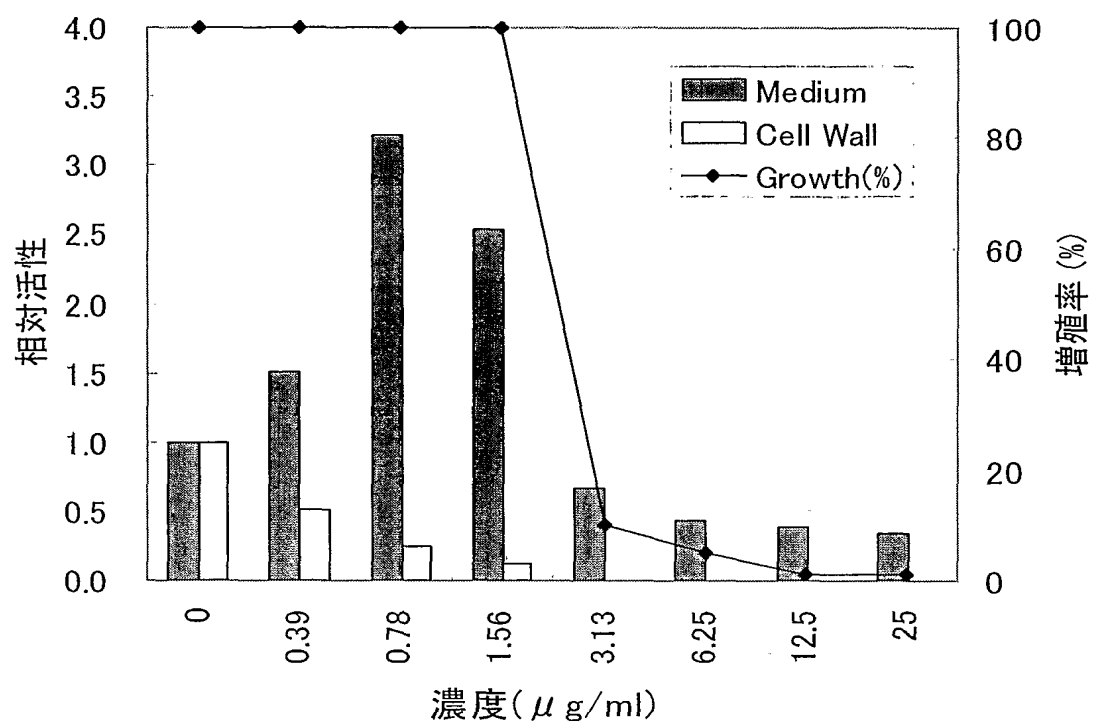
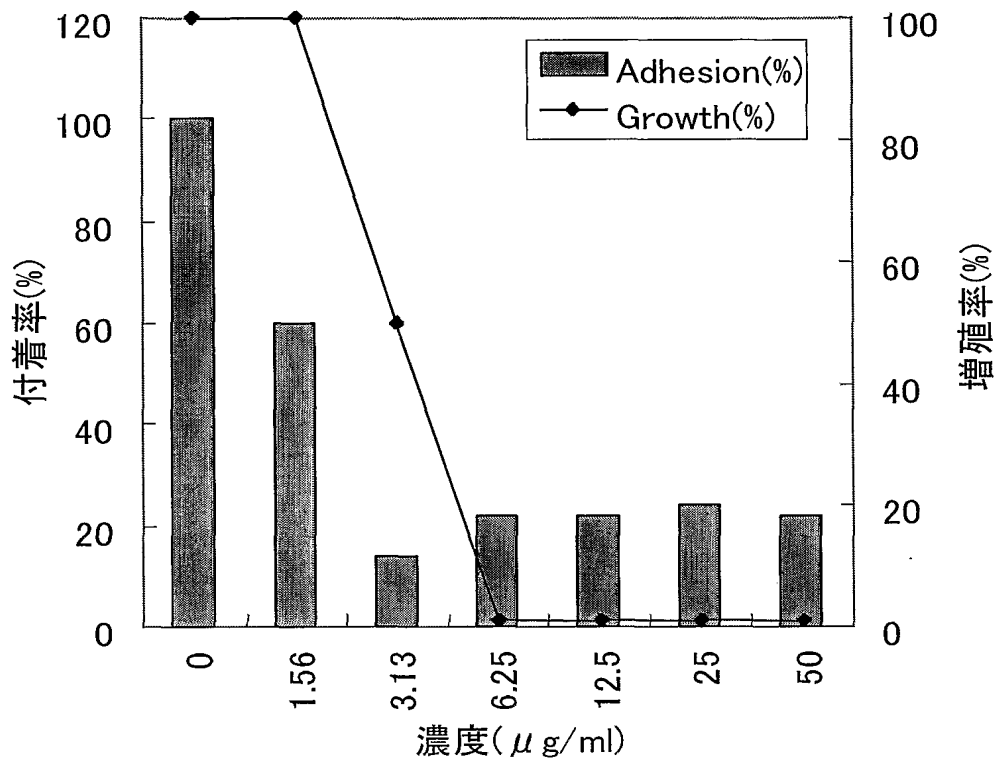
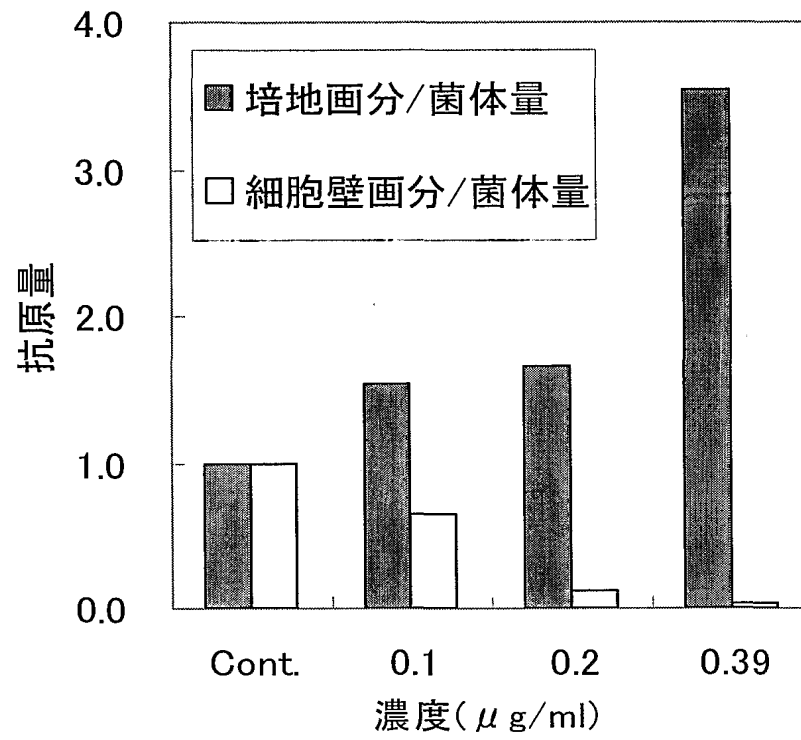


図 3



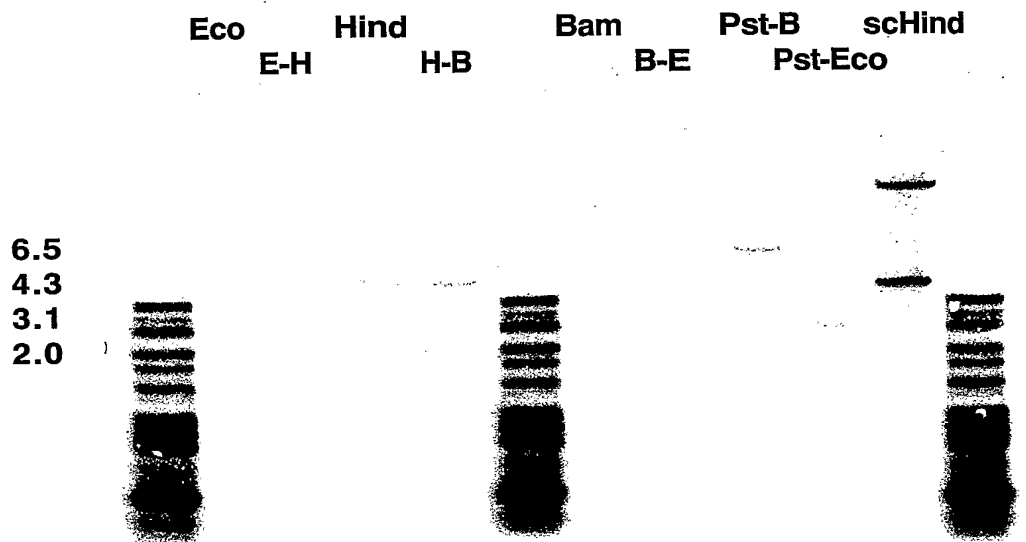
4 / 7

図 4



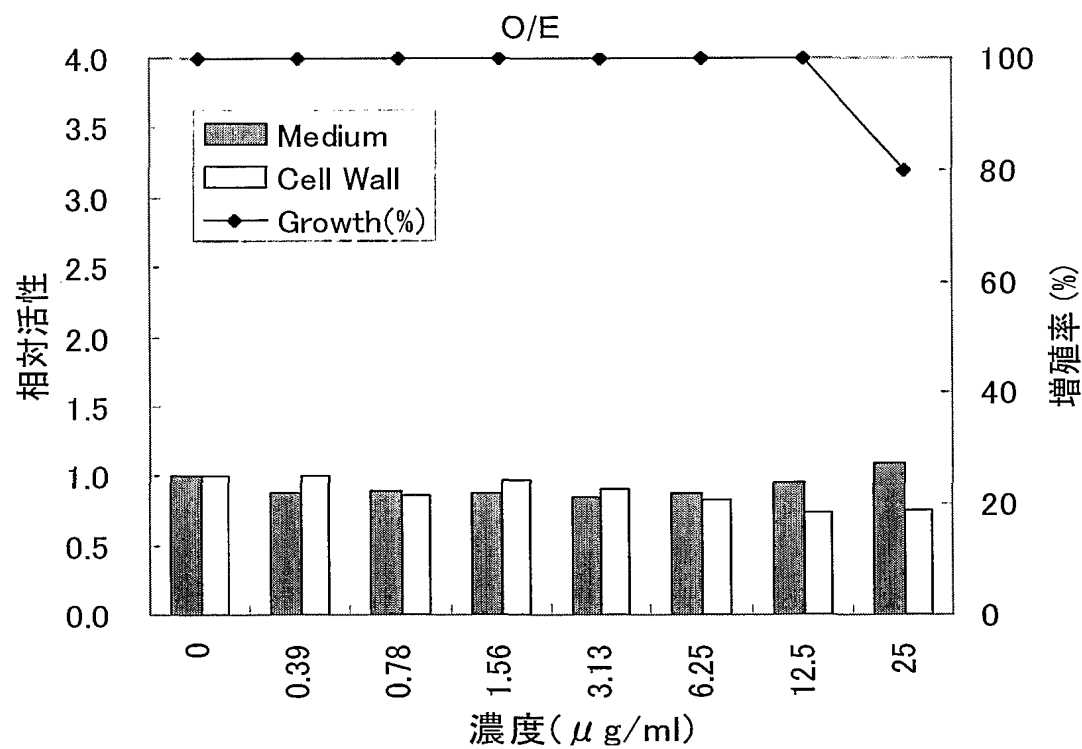
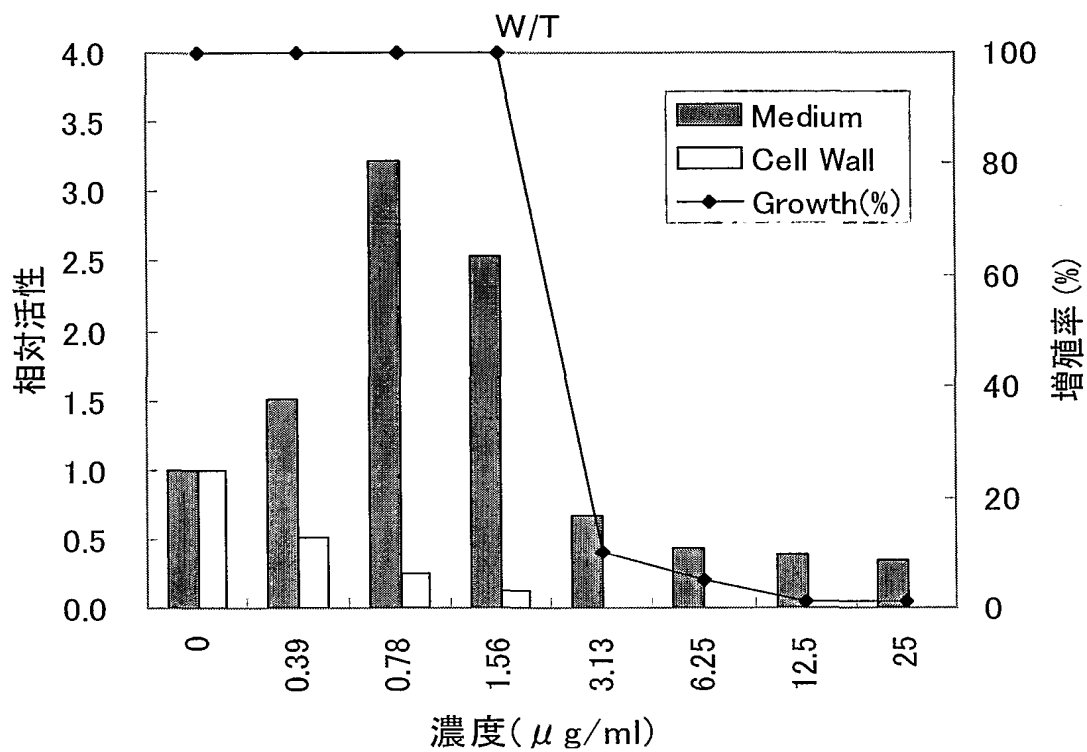
5 / 7

☒ 5

**Candida albicans Genomic DNA****probe: S.cerevisiae GWT 1cds**

6 / 7

図 6



7 / 7

図 7

<F-domain>

S. cerevisiae

C. albicans

S. pombe

ILAVDF	PI	FP	RR	F	AKVETWG	TS	L	MDLGVS	F
ILAVDF	PI	FP	RR	F	AKVETWG	TS	M	MDLGVS	F
ILAVDF	TL	FP	RR	Y	AKVETWG	TS	L	MDLGVS	F

<R-domain>

S. cerevisiae

C. albicans

S. pombe

YQEH	VT	EYG	V	HWNFF	I	T
YQEH	ET	EYG	I	HWNFF	F	T
YQEH	VS	EYG	M	HWNFF	F	T

1 / 8 2

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> GPI anchored protein transportor gene GWT1

<130> E1-A0101Y1P

<150> JP 2000-206968

<151> 2000-07-07

<150> JP 2000-316027

<151> 2000-10-17

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1497

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1494)

2/8 2

<400> 1

atg gca aca gta cat cag aag aat atg tcg act tta aaa cag aga aaa	48
Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys	
1 5 10 15	
gag gac ttt gtg aca ggg ctc aat ggc ggt tct ata aca gaa att aac	96
Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn	
20 25 30	
gca gtg aca tca att gct ttg gta act tac ata tca tgg aac tta ttg	144
Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu	
35 40 45	
aaa aat tcc aac ctt atg cct cct ggc att tcc agc gtg caa tac ata	192
Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile	
50 55 60	
att gat ttt gca ttg aac tgg gtt gct ttg ctt cta tct att act att	240
Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile	
65 70 75 80	
tat gct agt gaa cca tac ctt cta aac acg cta ata ctg tta cct tgt	288
Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys	
85 90 95	
ttg ctc gca ttc ata tat gga aaa ttt act agc tcg agt aaa cct tct	336
Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser	
100 105 110	
aat cca ata tac aat aaa aaa aaa atg att aca cag cgg ttc caa cta	384
Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu	
115 120 125	

3/8 2

gaa aaa aag ccg tat att act gcg tat cgt ggt ggg atg ctt att ctg 432
 Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu
 130 135 140
 act gct att gcc atc ttg gct gta gat ttt cca att ttc cca agg agg 480
 Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg
 145 150 155 160
 ttt gcc aag gtg gaa act tgg ggg aca tcc ctg atg gat ctt ggt gta 528
 Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val
 165 170 175
 gga tca ttc gtt ttc agt aac ggt att gtt tct tct agg gca ctg ttg 576
 Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu
 180 185 190
 aaa aac cta agc ttg aag agt aaa ccc agc ttc tta aaa aat gca ttt 624
 Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe
 195 200 205
 aat gcc tta aaa tca gga gga act cta ttg ttc cta gga ttg ctg agg 672
 Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg
 210 215 220
 ttg ttt ttt gta aaa aat ttg gaa tat caa gaa cat gtc aca gaa tat 720
 Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr
 225 230 235 240
 ggg gtt cat tgg aat ttt ttt atc acc cta tca ttg ttg cca ctt gta 768
 Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val
 245 250 255
 ttg acc ttt att gat ccc gtc aca aga atg gtt cca cgc tgc tca att 816
 Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile

4/8 2

260	265	270	
gca ata ttc att tca tgc att tat gaa tgg cta ctt tta aag gac gat			864
Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp			
275	280	285	
cgc act tta aac ttt tta att ttg gct gat aga aat tgt ttc ttc agt			912
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser			
290	295	300	
gct aat aga gaa ggc atc ttc tca ttt cta ggt tat tgc tcg att ttt			960
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe			
305	310	315	320
ctt tgg ggc caa aac acg gga ttt tac ttg ttg gga aat aaa cca act			1008
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr			
325	330	335	
tta aac aat ctt tat aag cct tct acg caa gac gta gtt gca gca tca			1056
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser			
340	345	350	
aag aag tct tcg act tgg gac tat tgg act tca gta acc cca tta agt			1104
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser			
355	360	365	
ggc ctc tgt ata tgg agt aca att ttt ctt gtt atc agc cag ttg gtt			1152
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val			
370	375	380	
ttt caa tac cat cct tat agt gtt tca aga agg ttt gct aac tta cca			1200
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro			
385	390	395	400
tat act ttg tgg gtc att act tat aat tta cta ttt ttg act ggg tac			1248

5/8 2

Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr
 405 410 415
 tgc ttg act gac aaa att ttc ggt aat tct tcg gaa tat tat aaa gtt 1296
 Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val
 420 425 430
 gcc gaa tgc ttg gaa tca atc aac tcc aat ggg ttg ttt tta ttt ttg 1344
 Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu
 435 440 445
 ttg gca aat gtc tct act ggt tta gtc aat atg tct atg gtc acg ata 1392
 Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile
 450 455 460
 gat tct tca ccc tta aaa tca ttc ctg gtt ttg ttg gca tac tgc tca 1440
 Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser
 465 470 475 480
 ttc ata gct gtc ata tcg gtt ttc ttg tat aga aaa aga ata ttc att 1488
 Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile
 485 490 495
 aag cta taa 1497
 Lys Leu

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

6/8 2

<400> 2

Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn
 20 25 30
 Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu
 35 40 45
 Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile
 50 55 60
 Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys
 85 90 95
 Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser
 100 105 110
 Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu
 115 120 125
 Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu
 130 135 140
 Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg
 145 150 155 160
 Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val
 165 170 175
 Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu
 180 185 190
 Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe

7/8 2

195	200	205
Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg		
210	215	220
Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr		
225	230	235
Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val		
245	250	255
Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile		
260	265	270
Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp		
275	280	285
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser		
290	295	300
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe		
305	310	315
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr		
325	330	335
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser		
340	345	350
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser		
355	360	365
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val		
370	375	380
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro		
385	390	395
Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr		400

8/8 2

405 410 415
 Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val
 420 425 430
 Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu
 435 440 445
 Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile
 450 455 460
 Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser
 465 470 475 480
 Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile
 485 490 495
 Lys Leu

<210> 3

<211> 1458

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<400> 3

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48
 Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

9/8 2

1	5	10	15	
act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta				96
Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu				
	20	25	30	
tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta				144
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu				
	35	40	45	
gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc				192
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser				
	50	55	60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt				240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val				
	65	70	75	80
att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca				288
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro				
	85	90	95	
tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa				336
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu				
	100	105	110	
cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg				384
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu				
	115	120	125	
ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca				432
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro				
	130	135	140	
aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta				480

1 0 / 8 2

Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu
 145 150 155 160
 gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa 528
 Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln
 165 170 175
 ttg atc aag aac cac acc gac aac tac aaa ttt agt tgg aag agt tat 576
 Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr
 180 185 190
 ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt 624
 Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val
 195 200 205
 tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa 672
 Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu
 210 215 220
 cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg 720
 His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt 768
 Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val
 245 250 255
 cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att gct tat gag gta gcg 816
 Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala
 260 265 270
 ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga 864
 Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg
 275 280 285

1 1/8 2

ctt gaa tct ctc atc acc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att 912
 Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile
 290 295 300
 gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt 960
 Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val
 305 310 315 320
 tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att 1008
 Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile
 325 330 335
 cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca 1056
 Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser
 340 345 350
 gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta 1104
 Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu
 355 360 365
 gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca 1152
 Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser
 370 375 380
 aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat 1200
 Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn
 385 390 395 400
 gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248
 Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly
 405 410 415
 aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe

1 2/8 2

420 425 430
 atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344
 Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile
 435 440 445
 aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392
 Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly
 450 455 460
 tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440
 Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
 465 470 475 480
 atc tac atc aag ctt tag 1458
 Ile Tyr Ile Lys Leu
 485

<210> 4

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 4

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu
 20 25 30
 Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

1 3/8 2

35	40	45
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser		
50	55	60
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val		
65	70	75
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu		
100	105	110
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu		
115	120	125
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro		
130	135	140
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu		
145	150	155
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln		
165	170	175
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr		
180	185	190
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val		
195	200	205
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu		
210	215	220
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly		
225	230	235
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val		

1 4/8 2

245	250	255
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala		
260	265	270
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg		
275	280	285
Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile		
290	295	300
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val		
305	310	315
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile		
325	330	335
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser		
340	345	350
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu		
355	360	365
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser		
370	375	380
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn		
385	390	395
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly		
405	410	415
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe		
420	425	430
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile		
435	440	445
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly		

1 5/8 2

450 455 460
 Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
 465 470 475 480
 Ile Tyr Ile Lys Leu
 485

<210> 5

<211> 1458

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1455)

<400> 5

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48
 Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta 96
 Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu
 20 25 30
 tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta 144
 Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu
 35 40 45

1 6/8 2

gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc	192
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser	
50 55 60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt	240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val	
65 70 75 80	
att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca	288
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro	
85 90 95	
tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa	336
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu	
100 105 110	
cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg	384
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu	
115 120 125	
ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca	432
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro	
130 135 140	
aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta	480
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu	
145 150 155 160	
gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa	528
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln	
165 170 175	
ttg atc aag aac cac acc gac aat tac aaa ttt agt tgg aag agt tat	576
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr	

1 7/8 2

180	185	190	
ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt			624
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val			
195	200	205	
tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa			672
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu			
210	215	220	
cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg			720
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly			
225	230	235	240
ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt			768
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val			
245	250	255	
cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att ggt tat gag gta gcg			816
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala			
260	265	270	
ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga			864
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg			
275	280	285	
ctt gaa tct ctc atc gcc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att			912
Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile			
290	295	300	
gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt			960
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val			
305	310	315	320
tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att			1008

1 8/8 2

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile
 325 330 335
 cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca 1056
 Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser
 340 345 350
 gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta 1104
 Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu
 355 360 365
 gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca 1152
 Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser
 370 375 380
 aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat 1200
 Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn
 385 390 395 400
 gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248
 Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly
 405 410 415
 aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe
 420 425 430
 atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344
 Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile
 435 440 445
 aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392
 Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly
 450 455 460

1 9 / 8 2

tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440
 Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
 465 470 475 480
 atc tac atc aag ctt tag 1458
 Ile Tyr Ile Lys Leu
 485

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 6

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu
 20 25 30
 Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu
 35 40 45
 Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser
 50 55 60
 Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val
 65 70 75 80
 Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro
 85 90 95

2 0 / 8 2

Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu
 100 105 110
 Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu
 115 120 125
 Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro
 130 135 140
 Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu
 145 150 155 160
 Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln
 165 170 175
 Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu
 210 215 220
 His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val
 245 250 255
 Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala
 260 265 270
 Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg
 275 280 285
 Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile
 290 295 300

2 1/8 2

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val
305 310 315 320
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile
325 330 335
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser
340 345 350
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu
355 360 365
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser
370 375 380
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn
385 390 395 400
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly
405 410 415
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe
420 425 430
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile
435 440 445
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly
450 455 460
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
465 470 475 480
Ile Tyr Ile Lys Leu
485

2 2/8 2

<210> 7

<211> 1458

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<400> 7

```
atgtcatcgt ctttaaaaca attgaaagaa caatttgtct cagatttgac tggtaggcaca 60
attgaagaaa tttatgctgt aaccagtata gcattatcat cttatttgtc ctttagattg 120
ttgaaaaagt ctcttgggtga tttagctttg atttacgact acattcttaa tgtgttgaca 180
attctagcat ccattactgt ttatagcaac agcccttctt atttgcatta ttttattggt 240
attccatcat tagttatata tctagtgaat taccatgttg agaaaccatc ttcaccccat 300
agacaaaatg atacaaaaga agataaatcg gacgaactat tgccgagaaa acaatttata 360
acagcctatc gttctcaaatt gttgataatt actaatctag ctatattagc tgttgatttt 420
cctattttcc caagaagatt tgccaaagtg gaaacatggg gcacgtcaat gatggattta 480
ggggttgggt cgttttgtgt ctccatgggg ttggctaatt ctgcacaatt gatcaagaac 540
cacaccgaca actacaaatt tagttggaag agttatttga aaacaatcaa gcagaacttt 600
atcaagtcag tgcctatact tgtttttagga gctattcggt ttgttagtgt taagcaattg 660
gactatcagg aacacgaaac agagtatgga atccattgga attttttctt cacattaggg 720
ttcttgccaa ttgtattggg aatattagac ccggtgttga atttggttcc acgcttcata 780
ataggaattg gtatctcaat tggttatgag gtagcgttga ataagactgg tttgttgaag 840
ttcattttga gcagcgaaaa cagacttgaa tctctcatcg ccatgaataa agaaggtatt 900
ttttcgttta ttggatatct ttgtattttt ataattgggt agtcttttgg gtcatttgtt 960
ttaacaggct acaaaacaaa gaacaactta ataaccatta gcaaaattcg tatttcacaaa 1020
aaacaacaca agaaagagct gctgctgttt ttctcagtcg ccactactca gggattatat 1080
ttggcatgta tcttctatca cttagctttc agtttgttca tcagcaactt atcattcttg 1140
caaccaattt caagacgatt ggccaatttc ccctacgtca tgtgggtcgt ttcgtacaat 1200
```

2 3/8 2

gctacgtttt tattatgtta tgacttaatt gaaaaattta tcccggggaa cettacttct 1260
actgtattgg attctattaa taacaatggg ttatttatct tcttggtcag caatttatta 1320
acagggttta ttaacatgtc catcaacact ttggaaacta gcaataaaat ggcagtgatt 1380
atcttgattg gctatagtct tacttggaca ttgctcgctt tatatttgga taagaggaag 1440
atctacatca agctttag 1458

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

gcagtcgact cgatgaggtc ttgctaatac ttg 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 4/8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

gcagaattcg acaccacaac ctggaacgta ttg

33

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

cccgaattca ctgacggtca aatccaagct act

33

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 5/8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

ggaagctttt ataacaacat agcggcagca gc

32

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

cccgcggccg cttgatagta agcttgcttg ggccgcatca tgtaattag

49

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 6 / 8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

cccggtacca aattaaagcc ttcgagcctc cca

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

cccggtacct gtttcagca tgagacttgc ata

33

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 7/8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

cccgcggcgcg ccccttccaa ttcgaaaacc ttccccagag cagcc

45

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

ggttcgaagc cgcaaaaaca gaacaacaaa tt

32

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 8/8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

ggtctagatt gcagtttttc aagaatgcgc ca

32

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gggtctagaa ctgacgggtca aatccaagct act

33

<210> 19

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2 9/8 2

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

ggaagctttt ataacaacat agcggcagca gc

32

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 20

Cys Phe Thr Ala Gly Thr Asn Thr Val The Phe Asn Asp Gly Asp Lys

1

5

10

15

Asp Ile

18

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 21

aaactgttca ctgaacaacc aaatctc

27

3 0 / 8 2

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 22

caactgtacc atttggttaga catcact

27

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 23

aaacagctgg gatcgcaata agaagacacg

30

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 24

3 1 / 8 2

aaacagctga tggaaatgtg gatggtgtg

29

<210> 25

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 25

atggcaacag tacatcagga gaatatgtcg actttaaaac cggatccccg tcgtttaaac 60

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 26

ttatagctta atgaatattc tttttctata caagaaaacc gaattcgagc tcgtttaaac 60

<210> 27

<211> 1380

<212> DNA

<213> *Schizosaccharomyces pombe*

3 2 / 8 2

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1380)

<400> 27

atg tca tac aaa ttg gaa aaa gaa gca ttt gtc tca aac ctg acg ggt	48
Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly	
1 5 10 15	
tca agt tcc att gag aca tgt ggc ttg tta tta ata gga att gct tgc	96
Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys	
20 25 30	
aac gtt ttg tgg gta aac atg act gcg aga aac atc tta ccc aaa ggg	144
Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly	
35 40 45	
aat ctt ggg ttt ctt gtt gag ttt ttc atc ttt tgc tta att cca tta	192
Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu	
50 55 60	
ttt gtc att tac gtt tca tcg aaa gtt ggc gtt ttc act ctt tgc ata	240
Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile	
65 70 75 80	
gcc tct ttt ttg cct tcc ttc gtc ctt cat gtt ata agt cca att aat	288
Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn	
85 90 95	
tgg gat gtg ctg aga aga aaa cct ggt tgt tgt ctt act aaa aaa aat	336
Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn	
100 105 110	

3 3/8 2

gaa aat act ttt gat cga cga att gct gga gtc aca ttt tat cgt tct 384
 Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser
 115 120 125
 caa atg atg ttg gtt act gtc act tgc atc ctg gcc gtt gac ttt acc 432
 Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr
 130 135 140
 ctt ttc ccg agg aga tat gcc aaa gtt gaa acc tgg gga aca tca ctg 480
 Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 atg gat ctt ggt gtt gga tct ttc atg ttt tct tca ggt act gtg gct 528
 Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala
 165 170 175
 gga cgg aaa aat gac att aaa aaa cca aat gcg ttt aaa aat gta ttg 576
 Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu
 180 185 190
 tgg aat tct ttc atc ctt ttg att tta gga ttt gcg cgc atg ttt tta 624
 Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu
 195 200 205
 acg aaa agc atc aat tac caa gaa cat gta agc gaa tat ggc atg cat 672
 Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His
 210 215 220
 tgg aac ttt ttt ttc acc cta ggt ttc atg gct ctt ggc gta ttt ttt 720
 Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe
 225 230 235 240
 ttt cgt cgt tct tta aaa aaa gtc tcc tat ttt aat tta gca acc ttc 768
 Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe

3 4/8 2

245	250	255	
att act ctt ctt cat cat tgt ttg ctt gtt tta acc cct ttc caa aaa			816
Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys			
260	265	270	
tgg gca cta tcc gcc ccc aga aca aat att ttg gct cag aat aga gag			864
Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu			
275	280	285	
ggt att gct tct ctt ccc gga tac att gct att tac ttt tat gga atg			912
Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met			
290	295	300	
tat acc ggt agt gta gtt ttg gct gat cga cct cta atg tat act aga			960
Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg			
305	310	315	320
gct gag tcg tgg aag cgc ttt caa cgt cta tta ttc ccg cta tgc att			1008
Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile			
325	330	335	
ttg tta gtg ttg tat ctt gtg tct aac ttt ttg tca gtt ggt gtt tct			1056
Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser			
340	345	350	
cgc cga ctt gct aat acg cct tat gtt gcg aat gtt gcc ttt atc aat			1104
Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn			
355	360	365	
atg ttt ttt ctt act ata tac ata ctt att gat gcc tat tta ttc cca			1152
Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro			
370	375	380	
tct tct gtg cca tat gga agt cgc gtc ccc aaa ctg ctt gaa gat gcc			1200

3 5/8 2

Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 aat aat aat ggc ttg ttg gtg ttt ttg att gct aac gtt tta aca gga 1248
 Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly
 405 410 415
 gta gtt aat tta tcg ttc gac acc ctt cat tct agc aat gca aaa ggc 1296
 Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly
 420 425 430
 ttg aca atc atg act atg tat ctt ttt att att tgc tat atg gca cat 1344
 Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His
 435 440 445
 tgg ctt gct caa cac gga att cgt ttt cgc ctt tag 1380
 Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu
 450 455 460

<210> 28

<211> 459

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 28

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys
 20 25 30

3 6 / 8 2

Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly
 35 40 45
 Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu
 50 55 60
 Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile
 65 70 75 80
 Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn
 85 90 95
 Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn
 100 105 110
 Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser
 115 120 125
 Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr
 130 135 140
 Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala
 165 170 175
 Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu
 180 185 190
 Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu
 195 200 205
 Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His
 210 215 220
 Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe
 225 230 235 240

3 7/8 2

Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe
 245 250 255
 Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys
 260 265 270
 Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu
 275 280 285
 Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met
 290 295 300
 Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg
 305 310 315 320
 Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile
 325 330 335
 Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser
 340 345 350
 Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn
 355 360 365
 Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro
 370 375 380
 Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly
 405 410 415
 Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly
 420 425 430
 Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His
 435 440 445

3 8/8 2

Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu

450

455

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)

3 9/8 2

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)

<223> n represents a, g, c or t.

<400> 29

gcnaargtng aracntgggg nachwsnytn atgga

4 0/8 2

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

4 1/8 2

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

<400> 30

ttccartgna yncertaytc ngtnacrtgy tcytgrta

38

<210> 31

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

4 2/8 2

<400> 31

gtraaraara arttccartg nayncertay tc

32

<210> 32

<211> 188

<212> DNA

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 32

atggatctgg gcgttggatc gtttgtcttt tcgggcggag tagtatccgc tcgctcacta 60

ctcaagagca ggaccaatgg ctctaaaagg ttgcctcttg ccaagaggtt gattgcgtcg 120

acgcgacact ctattcctct gctcgtcctc ggctgattc ggctatacag cgtcaaaggc 180

ttggacta 188

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 33

4 3/8 2

ggagtagtat ccgctcgctc acta

24

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 34

gtccaagcct ttgacgctgt atagc

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 35

gggatgtgct gcaaggcgat taagt

25

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 36

4 4/8 2

tttatgcttc cggctcgtat gttgtg

26

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 37

aaaggtgcaa atccccgcggc attga

25

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 38

agttcactat atatcttcaa cacaccac

28

<210> 39

<211> 1576

<212> DNA

<213> Aspergillus fumigatus

4 5/8 2

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(1536)

<400> 39

aaggtgcaaa tcccgcggca ttgagtcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc 54

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg

1

5

aaa gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc 102

Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile

10

15

20

aac gcc gtc acc ttg gtt gct tgc gta tcc gtt ttt ctg tgg tca att 150

Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile

25

30

35

40

cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac agc gcc gct gcc ctt 198

Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu

45

50

55

ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc ttg ttc gca acc act 246

Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr

60

65

70

tta tac tct tgc gcg cct ctt ctt ctc aat ctc ctt cta ata tct ccc 294

Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro

75

80

85

gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct cgg acc ccc gtc aaa 342

Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys

90

95

100

4 6 / 8 2

gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg aaa gat gac tcg aaa 390
 Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys
 105 110 115 120
 cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att cat cca ttt ctc acg 438
 His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr
 125 130 135
 aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc atc gct atc ttg gct 486
 Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala
 140 145 150
 gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc aag gta gaa aac tgg 534
 Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp
 155 160 165
 ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tcg ttt gtc ttt tcg ggc 582
 Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly
 170 175 180
 gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc agg acc aat ggc tct 630
 Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser
 185 190 195 200
 aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg tcg acg cga cac tct 678
 Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser
 205 210 215
 att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta tac agc gtc aaa ggc 726
 Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly
 220 225 230
 ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc gta cat tgg aac ttc 774
 Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe

4 7/8 2

235	240	245	
ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg gag gtc ttc gac gcc			822
Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala			
250	255	260	
ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc tcc gtg ggg atc gcc			870
Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala			
265	270	275	280
gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac ttg aaa agc tac atc			918
Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile			
	285	290	295
ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc aag aat cgt gaa ggc			966
Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly			
300	305	310	
gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt ctt gct ggt cgt gcg			1014
Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala			
315	320	325	
atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct ttc tca aga agc cca			1062
Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro			
330	335	340	
gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt ggc gtg caa gcg tta			1110
Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu			
345	350	355	360
gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act tat gcg atg gga tac			1158
Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr			
	365	370	375
gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct aac atg ccc tat gtc			1206

4 8/8 2

Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val
 380 385 390
 ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg ttt gtg ttc tgc ctg 1254
 Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu
 395 400 405
 atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg aca acg act caa gag 1302
 Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu
 410 415 420
 agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc cga atc atg tcg gcc 1350
 Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala
 425 430 435 440
 ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg gcc aat ctt ctg act 1398
 Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr
 445 450 455
 gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat gct aat aca gcg cag 1446
 Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln
 460 465 470
 gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att atc aca ggg gtt gct 1494
 Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala
 475 480 485
 cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt cct ttc tag 1536
 Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu Pro Phe
 490 495 500
 ggtattttacg agcaattggg ggtgtgttga agatatatag 1576

4 9 / 8 2

<210> 40.

<211> 501

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 40

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu
1 5 10 15
Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser
20 25 30
Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe
35 40 45
Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val
50 55 60
Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu
65 70 75 80
Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr
85 90 95
Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala
100 105 110
Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser
115 120 125
Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val
130 135 140
Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg
145 150 155 160

5 0 / 8 2

Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly
 165 170 175
 Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu
 180 185 190
 Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg
 195 200 205
 Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu
 210 215 220
 Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr
 225 230 235 240
 Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro
 245 250 255
 Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr
 260 265 270
 Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu
 275 280 285
 Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser
 290 295 300
 Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu
 305 310 315 320
 Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg
 325 330 335
 Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu
 340 345 350
 Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu
 355 360 365

5 1/8 2

Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg

370

375

380

Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr

385

390

395

400

Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala

405

410

415

Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe

420

425

430

Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile

435

440

445

Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser

450

455

460

Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr

465

470

475

480

Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile

485

490

495

Lys Val Leu Pro Phe

500

<210> 41

<211> 1648

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

5 2/8 2

<221> intron

<222> (122).. (198)

<220>

<221> CDS

<222> (26).. (121)

<220>

<221> CDS

<222> (199).. (1608)

<400> 41

gcaaatcccg cggcattgag tcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc aaa 52

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys

1

5

gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc aac 100

Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn

10

15

20

25

gcc gtc acc ttg gtt gct tcg gttcgtgtta ctatcttatt gtggctactt 151

Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

30

cgcctacatt gtttctcgac taaccgagtc tctttgcgat caatcag gta tcc gtt 207

Val Ser Val

5 3/8 2

35

ttt ctg tgg tca att cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac 255

Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr

40

45

50

agc gcc gct gcc ctt ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc 303

Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile

55

60

65

ttg ttc gca acc act tta tac tct tcg gcg cct ctt ctt ctc aat ctc 351

Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu

70

75

80

ctt cta ata tct ccc gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct 399

Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro

85

90

95

cgg acc ccc gtc aaa gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg 447

Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly

100

105

110

115

aaa gat gac tcg aaa cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att 495

Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile

120

125

130

5 4/8 2

cat cca ttt ctc acg aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc 543

His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys

135

140

145

atc gct atc ttg gct gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc 591

Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala

150

155

160

aag gta gaa aac tgg ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tcg 639

Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser

165

170

175

ttt gtc ttt tcg ggc gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc 687

Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser

180

185

190

195

agg acc aat ggc tct aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg 735

Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala

200

205

210

tcg acg cga cac tct att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta 783

Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu

215

220

225

tac agc gtc aaa ggc ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc 831

Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly

5 5/8 2

230	235	240	
gta cat tgg aac ttc ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg 879			
Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val			
245	250	255	
gag gtc ttc gac gcc ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc 927			
Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu			
260	265	270	275
tcc gtg ggg atc gcc gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac 975			
Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp			
	280	285	290
ttg aaa agc tac atc ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc 1023			
Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser			
	295	300	305
aag aat cgt gaa ggc gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt 1071			
Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe			
310	315	320	
ctt gct ggt cgt gcg atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct 1119			
Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser			
325	330	335	

5 6/8 2

ttc tca aga agc cca gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt 1167

Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu

340

345

350

355

ggc gtg caa gcg tta gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act 1215

Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr

360

365

370

tat gcg atg gga tac gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct 1263

Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala

375

380

385

aac atg ccc tat gtc ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg 1311

Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu

390

395

400

ttt gtg ttc tgc ctg atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg 1359

Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg

405

410

415

aca acg act caa gag agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc 1407

Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser

420

425

430

435

cga atc atg tcg gcc ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg 1455

Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu

5 7/8 2

440

445

450

gcc aat ctt ctg act gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat 1503

Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp

455

460

465

gct aat aca gcg cag gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att 1551

Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile

470

475

480

atc aca ggg gtt gct cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt 1599

Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu

485

490

495

cct ttc tag ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag 1648

Pro Phe

500

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 42

gccataataa gctaccgaat tgcaatg

27

5 8/8 2

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 43

cattaacacc cccattgaca accacg

26

<210> 44

<211> 1869

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 44

ggggattaca agtcggccaa agaggccttt gtctcggata acccaggtgc ttctatctgg 60
agtatcaacg ctgtcagcct ggtegcactg gtatgtagct cgttctccga ggggttctgt 120
catttgagaga cgcttattaa ttgggatcgc aggcgacata tgctctctgg atcgccctat 180
cgccgtacat ccgtcatgga ctctgaaca actacctgat ctgtgttctt cccctattat 240
tcgggggtgac catctttctca atttcgcctc tcgtatttac ctcttttttg tccattatct 300
ccttcgcttt catcacgaaa tcccaaaaat gcttcaaate tgtcagttcg cccgaaaagc 360
caaaaggcca atggctagac gaatcagact ccgatgagga accagcggaa cctgcttctg 420
cagctggatc tgcagcagtc tcaccagtaa agcttctacc ttcccaagtg gcgttcgctt 480
cgggatccct attatctccc gatccgacaa catecccat gtcgccaagt agttcttcag 540

5 9/8 2

cttcaggaca tgaagaccct ttggggatta tgggcgttaa cagacggagg tcgctattag 600
 aaggagtttc gcttgatgtt ccgtcacata tcgactccaa ggtcagaata tctcctgttc 660
 cctacttgag gctcaaaaag tctagggcaa cgaaggcgca atgggtgaaa gaaaaggga 720
 gattaccatt tttgacagtg taccgagcgc acatgatgct catgactggt atctgcatct 780
 tggcggtaga ttttgaagtg tttcctagat ggcagggcaa gtgcgaagat tttggtacta 840
 gtctggtaag ctttccttca gccatgggcc agtgcacc gctctacttg ccgtagatgg 900
 acgtgggtgt cgggtcattc gtcttttccc tcgggtctcgt ctccacaaaa tctctttctc 960
 ctccacctcc aactcctacg cctcctcgc ccgctctcaa ctctcacatc attccccctca 1020
 ccccgteccc gttcacttcc atcctcatct cgctccgaaa atccateccc atcctcgtcc 1080
 tcggctttat acggttgatt atgggtcaagg gatctgatta tcctgagcat gtgacggagt 1140
 acggcgtgca ctggaatttc ttcttcaccc tcgcattgggt tcctgtgctc gccgtgggca 1200
 ttcgaccatt gacgcagtgg cttecgctgga gtgtgcttgg ggtaatcatc tctttgctgc 1260
 atcagctgtg gttaacatat tatctccaat ccatcgtctt ctcatcggc cggtcaggta 1320
 tctttctagc aaacaaggaa ggcttctcct ctcttctcgg ttatctttcc atatttttga 1380
 tcggcttgct tattggagat catgttttaa ggctcagttt accaccaaga agagagaggg 1440
 tcgtgtcaga aacaaatgaa gagcatgagc agagtcattt tgagagaaaa aaattggatt 1500
 tgattatgga gttgattgga tatagcttag gctgggtgggc actcttagga ggctggattt 1560
 gggccggcgg ggaggtatcc aggcgttttag taagtggaca tctttggtaa tattgtacct 1620
 atactaatcc ctgcataaag gccaacgctc cttatgtatt ttgggtagcg gcatacaata 1680
 ccacctttct cctcggtac ctctcctta cccacattat tccatctccc acctcttccc 1740
 aaacatcacc atcgatctta gtgcctcctt tgctcgacgc tatgaataaa aacggtctcg 1800
 cgatatTTTTT ggcgccaac ttgcttacag gactgggtgaa tgtgagcatg aagacaatgt 1860
 atgcgcgg 1869

6 0 / 8 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 45

gtaaaggaag gcgctagaaa agatatg

27

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 46

ctcatcggag tctgattcgt ctagcc

26

<210> 47

<211> 470

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 47

gaaggcgcta gaaaagatat ggtcttgtca tagcattaaa tccccgcat aataagctac 60

tgaattgcaa tgggggatta caagtcggcc aaagaggcct ttgtctcgga taaccaggt 120

gcttctatct ggagtatcaa cgctgtcagc ctggtcgcac tggatatgtag ctcgttctcc 180

6 1/8 2

gaggggttct gtcatttga gacgcttatt aattgggata gcaggcgaca tatgctctct 240
ggatcgccctt atcgccgtac atccgtcatg gactcctgaa caactacctg atctgtgttc 300
ttcccctatt attcgggggtg accatcttct caacttcgcc tctcgtatctt acctcttttt 360
tgtccattat ttccctcgct ttcatacaga aatccccaaa atgcttcaaa tctgtcagtt 420
cgcccgaaaa gccaaaaggc caatggctag acgaatcaga ctccgatgag 470

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 48

gcccacgcgt cgactagtag tttttttttt ttttttt 37

<210> 49

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 49

catcttggcg gtagattttg aagtgttcc 26

<210> 50

6 2/8 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 50

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 51

<211> 1136

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 51

gcggtagatt ttgaagtgtt ccctagatgg cagggcaagt gcgaagattt tgggtactagt 60
ctgatggacg tgggtgtcgg gtcattcgtc tttccctcg gtctcgtctc cacaaaatct 120
ctttctcctc cacctccaac tctacgccc tctcgcgccg ctctcaactc tcacatcatt 180
cccctcacc cgtccccgtt cacttccatc ctcatctcgc tccgaaaate catccccatc 240
ctcgtcctcg gctttatacg gttgattatg gtcaagggat ctgattatcc tgagcatgtg 300
acggagtacg gcgtgcactg gaatttcttc ttcacctcg cattgggttc tgtgctcgcc 360
gtgggcattc gaccattgac gcagtggctt cgctggagtg tgcttgggggt aatcatctct 420
ttgctgcac agctgtgggt aacatattat ctccaatcca tegtcttctc attcggccgg 480
tcaggatatct ttctagcaaa caaggaaggc ttctcctctc ttcttggtta tctttccata 540
tttttgatcg gcttgtctat tggagatcat gttttaaggc tcagtttacc accaagaaga 600
gagagggtcg tgtcagaaac aatgaagag catgagcaga gtcattttga gagaaaaaaa 660
ttggatttga ttatggagtt gattggatat agcttaggct ggtgggcact cttaggaggc 720

6 3/8 2

tggatttggg ccggcgggga ggtatccagg cgtttagcca acgctcctta tgtatttttg 780
gtagcggcat acaataccac ctttctctc ggctacctcc tccttaccce cattattcca 840
tctcccacct ctteccaaac atcaccatcg atcttagtgc ctcccttgct cgacgctatg 900
aataaaaacg gtctcgogat atttttggcg gccaaattgc ttacaggact ggtgaatgtg 960
agcatgaaga caatgtatgc gccggcgtgg ttgtcaatgg ggggtgtaat gttgtatacc 1020
ttgacaatca gttgtgtagg gtggatactg aaaggacgga ggatcaagat atagttaaag 1080
tgtttaccat gcaggatact gagtatctcg gttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1136

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 52

gtcttgtcat agcattaaat ccccgcc

27

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 53

gaaccgagat actcagtatc ctgcatgg

28

6 4/8 2

<210> 54

<211> 2045

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<220>

<221> intron

<222> (137).. (198)

<220>

<221> intron

<222> (892).. (942)

<220>

<221> intron

<222> (1636).. (1686)

<220>

<221> CDS

<222> (44).. (2001)

<400> 54

gtcatagcat taaatccccg ccataataag ctactgaatt gca atg ggg gat tac 55

Met Gly Asp Tyr

6 5/8 2

```

aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca ggt gct tct atc      103
Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro Gly Ala Ser Ile
      5              10              15              20
tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gtatgtagct cgttctccga    156
Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu
      25              30
ggggttctgt catttgga cgttattaa ttgggatcgc ag gcg aca tat gct      210
                                   Ala Thr Tyr Ala
                                   35
ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc ctg aac aac      258
Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu Leu Asn Asn
      40              45              50
tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc atc ttc tca      306
Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr Ile Phe Ser
      55              60              65
act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att tcc ctc gct      354
Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile Ser Leu Ala
      70              75              80
ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt tcg ccc gaa      402
Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser Ser Pro Glu
      85              90              95
aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat gag gaa cca      450
Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Pro
100              105              110              115
gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca cca gta aag      498
Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser Pro Val Lys

```


6 6/8 2

120	125	130	
ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tgc gga tcc cta tta tct ccc			546
Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu Leu Ser Pro			
135	140	145	
gat ccg aca aca tcc ccc atg tgc cca agt agt tct tca gct tca gga			594
Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly			
150	155	160	
cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg agg tgc cta			642
His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg Arg Ser Leu			
165	170	175	
tta gaa gga gtt tgc ctt gat gtt ccg tca cat atc gac tcc aag gtc			690
Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp Ser Lys Val			
180	185	190	195
aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct agg gca acg			738
Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser Arg Ala Thr			
200	205	210	
aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt ttg aca gtg			786
Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe Leu Thr Val			
215	220	225	
tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc ttg gcg gta			834
Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile Leu Ala Val			
230	235	240	
gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa gat ttt ggt			882
Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu Asp Phe Gly			
245	250	255	
act agt ctg gtaagctttc cttcagccat ggtccagtgc tcaccgctct			931

6 7/8 2

Thr Ser Leu

260

acttgccgta g atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt tcc ctc ggt 981

Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Leu Gly

265

270

275

ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act cct acg ccc 1029

Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Pro Thr Pro

280

285

290

tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc ccg tcc ccg 1077

Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr Pro Ser Pro

295

300

305

ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc atc ctc gtc 1125

Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro Ile Leu Val

310

315

320

ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat tat cct gag 1173

Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp Tyr Pro Glu

325

330

335

cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc acc ctc gca 1221

His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Ala

340

345

350

355

ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg cag tgg ctt 1269

Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr Gln Trp Leu

360

365

370

cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat cag ctg tgg 1317

Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His Gln Leu Trp

375

380

385

6 8 / 8 2

tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc cgg tca ggt 1365
 Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly Arg Ser Gly
 390 395 400
 atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct ggt tat ctt 1413
 Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro Gly Tyr Leu
 405 410 415
 tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt tta agg ctc 1461
 Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val Leu Arg Leu
 420 425 430 435
 agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca aat gaa gag 1509
 Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr Asn Glu Glu
 440 445 450
 cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg att atg gag 1557
 His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu Ile Met Glu
 455 460 465
 ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga ggc tgg att 1605
 Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly Gly Trp Ile
 470 475 480
 tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gtaagtggac atcttttgta 1655
 Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu
 485 490
 atattgtacc tataactaatc cctgcataaa g gcc aac gct cct tat gta ttt 1707
 Ala Asn Ala Pro Tyr Val Phe
 495 500
 tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc tac ctc ctc ctt 1755
 Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Leu

6 9/8 2

505	510	515	
acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca tca cca tcg atc			1803
Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr Ser Pro Ser Ile			
520	525	530	
tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac ggt ctc gcg ata			1851
Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn Gly Leu Ala Ile			
535	540	545	
ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat gtg agc atg aag			1899
Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn Val Ser Met Lys			
550	555	560	
aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg tta atg ttg tat			1947
Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val Leu Met Leu Tyr			
565	570	575	580
acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa gga cgg agg atc			1995
Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys Gly Arg Arg Ile			
585	590	595	
aag ata tagttaaagt gttaccatg caggatactg agtatctcgg ttca			2045
Lys Ile			

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 55

7 0/8 2

cagcctggtc gcactggcga cat

23

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 56

cataaggagc gttggctaaa cgcct

25

<210> 57

<211> 1418

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 57

cagcctggtc gcactggcga catatgctct ctggatcgcc ttatcgccgt acatccgtca 60
tggactcctg aacaactacc tgatctgtgt tcttccccta ttattcgggg tgaccatctt 120
ctcaacttcg cctctcgtat ttacctcttt tttgtccatt atttccctcg ctttcatac 180
gaaatcccaa aaatgcttca aatctgtcag ttcgcccga aagccaaaag gccaatggct 240
agacgaatca gactccgatg aggaaccage ggaacctgct tctgcagctg gatctgcagc 300
agtctcacca gtaaagcttc taccttccca agtggcgctt gcttcgggat ccctattatc 360
tcccgatccg acaacatccc ccatgtcgcc aagtagttct tcagcttcag gacatgaaga 420
ccctttgggg attatgggcg ttaacagacg gaggtcgcta ttagaaggag tttcgcttga 480

7 1/8 2

```

tggtccgtca catatcgact ccaaggtcag aatatctcct gttccctact tgaggctcaa 540
aaagtctagg gcaacgaagg cgcaatgggt gaaagaaaag ggaagattac catttttgac 600
agtgtaccga gcgcacatga tgctcatgac tgttatctgc atcttggcgg tagattttga 660
agtgtttcct agatggcagg gcaagtgcga agattttggt actagtctga tggacgtggg 720
tgtcgggtca ttcgtctttt ccctcgggtct cgtctccaca aaatctcttt ctcctccacc 780
tccaactcct acgccctcct cgcccgtctt caactctcac atcattcccc tcaccccgctc 840
cccgttcact tccatcctca tctcgtctcg aaaatccatc cccatcctcg tctcgggtt 900
tatacggttg attatggtca agggatctga ttatcctgag catgtgacgg agtacggcgt 960
gcactggaat ttctttcttca ccctcgcatt ggttcctgtg ctgccgtgg gcattcgacc 1020
attgacgcag tggtctcgct ggagtgtgct tggggtaatc atctctttgc tgcattcagct 1080
gtggttaaca tattatctcc aatccatcgt cttctcattc ggccggtcag gtatctttct 1140
agcaaacaag gaaggcttct cctctcttcc tggttatctt tccatatttt tgategggtt 1200
gtctattgga gatcatgttt taaggctcag tttaccacca agaagagaga gggtcgtgtc 1260
agaaacaaat gaagagcatg agcagagtca ttttgagaga aaaaaattgg atttgattat 1320
ggagttgatt ggatatagct taggctgggtg ggcactctta ggaggctgga tttgggccgg 1380
cgggggaggta tccaggcggt tagccaacgc tccttatg 1418

```

<210> 58

<211> 1797

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1794)

7 2/8 2

<400> 58

atg ggg gat tac aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca	48
Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
ggt gct tct atc tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gcg	96
Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala	
20 25 30	
aca tat gct ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc	144
Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu	
35 40 45	
ctg aac aac tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc	192
Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr	
50 55 60	
atc ttc tca act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att	240
Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile	
65 70 75 80	
tcc ctc gct ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt	288
Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser	
85 90 95	
tcg ccc gaa aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat	336
Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp	
100 105 110	
gag gaa cca gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca	384
Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser	
115 120 125	

7 3/8 2

cca gta aag ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta 432
 Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu
 130 135 140
 tta tct ccc gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca 480
 Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 gct tca gga cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg 528
 Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg
 165 170 175
 agg tcg cta tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac 576
 Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp
 180 185 190
 tcc aag gtc aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct 624
 Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser
 195 200 205
 agg gca acg aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt 672
 Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe
 210 215 220
 ttg aca gtg tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc 720
 Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile
 225 230 235 240
 ttg gcg gta gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa 768
 Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu
 245 250 255
 gat ttt ggt act agt ctg atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt 816
 Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe

7 4/8 2

260	265	270	
tcc ctc ggt ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act			864
Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr			
275	280	285	
cct acg ccc tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc			912
Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr			
290	295	300	
cgc tcc cgc ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc			960
Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro			
305	310	315	320
atc ctc gtc ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat			1008
Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp			
325	330	335	
tat cct gag cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc			1056
Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe			
340	345	350	
acc ctc gca ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg			1104
Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr			
355	360	365	
cag tgg ctt cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat			1152
Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His			
370	375	380	
cag ctg tgg tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc			1200
Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly			
385	390	395	400
cgg tca ggt atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct			1248

7 5/8 2

Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro	
405	410
415	
ggt tat ctt tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt	1296
Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val	
420	425
430	
tta agg ctc agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca	1344
Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr	
435	440
445	
aat gaa gag cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg	1392
Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu	
450	455
460	
att atg gag ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga	1440
Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly	
465	470
475	480
ggc tgg att tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gcc aac gct	1488
Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala	
485	490
495	
cct tat gta ttt tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc	1536
Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly	
500	505
510	
tac ctc ctc ctt acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca	1584
Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr	
515	520
525	
tca cca tcg atc tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac	1632
Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn	
530	535
540	

7 6/8 2

ggt ctc gcg ata ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat 1680
 Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn
 545 550 555 560
 gtg agc atg aag aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg 1728
 Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val
 565 570 575
 tta atg ttg tat acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa 1776
 Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys
 580 585 590
 gga cgg agg atc aag ata tag 1797
 Gly Arg Arg Ile Lys Ile
 595

<210> 59

<211> 598

<212> PRT

<213> *Cryptococcus neoformans*

<400> 59

Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala
 20 25 30
 Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu
 35 40 45

7 7/8 2

Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr
 50 55 60
 Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser
 85 90 95
 Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp
 100 105 110
 Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser
 115 120 125
 Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu
 130 135 140
 Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg
 165 170 175
 Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp
 180 185 190
 Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser
 195 200 205
 Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe
 210 215 220
 Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile
 225 230 235 240
 Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu
 245 250 255

7 8/8 2

Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe
 260 265 270
 Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr
 275 280 285
 Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr
 290 295 300
 Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro
 305 310 315 320
 Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp
 325 330 335
 Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe
 340 345 350
 Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr
 355 360 365
 Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His
 370 375 380
 Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly
 385 390 395 400
 Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro
 405 410 415
 Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val
 420 425 430
 Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr
 435 440 445
 Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu
 450 455 460

7 9/8 2

Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly
 465 470 475 480
 Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala
 485 490 495
 Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly
 500 505 510
 Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr
 515 520 525
 Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn
 530 535 540
 Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn
 545 550 555 560
 Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val
 565 570 575
 Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys
 580 585 590
 Gly Arg Arg Ile Lys Ile
 595

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

8 0 / 8 2

. <223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 60

aaagaattca tggcaacagt acatcagaag

30

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 61

gggcactgtt gaaaaaccta

20

<210> 62

<211> 1428

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> promoter

8 1 / 8 2

<222> (1).. (1428)

<400> 62

gttgttcaaa atgggggtaa aattgagacg tcttacttga ggggcattta cgatcattct 60
tattacatca ttccaagtaa taaagctctt gactccttca atgatttacc tgagattata 120
gatgataatg atggtatagt tacagaattt ttcatgaac gctgcttgta ttatcaaaaa 180
ttactacacc caatagattt atggtcaaaa cccttcctca gcacaataga gtttcaagtt 240
tcgtcttctt caaagttatt gcatcatgaa ttttcttctt ccccttttct gaatgttact 300
atcactggat tctctggcgt agagctgtta catctgacta aagtattaaa tcttctaaaa 360
ccaatgggca tcaattatgt agaatacctc aataaatcca ctgacattct gctaataaac 420
ttagcagctt taccagtat cccgaaaacc catccgttat ggtcgaatga atttagcgat 480
ctttttactc agttttgcat taataacaat aatgatgac ctggtgataa taacagaaaa 540
gattttcaaa ataattcaat cttgagaaat tcgatgaaaa ggaaaattga atatatcaag 600
aaattccact ccataccggt agttactcca gcatttattt ttaaattatt gtccgctgca 660
tctggagaaa ataatgaaat ctttttaaac aatatcaagt ggtgtattat ctgcccaga 720
ggacacaagg acgattttta atgtaagata aaaaaacat actataccag cattagtcca 780
gaaaaaaagt accaaaacaa tgatccaaaa atcgacaaaa ctattctttt gaaaagaaac 840
aattcctcat tatcgagca ctctatgaaa gataccaaaa acgaattatt gcagaaaatt 900
agagaaactg attctggaag aaaaaagcgt agtgtctcat cgagtatcat ggatgtttct 960
tcagagagac aaatgccgga tacgaaaagg atcaagttgg agtcaactgcc aaaaaatttc 1020
gttcctaaac aaattaaacg aaccacgagt tggggcaciaa taatgtcaga aaatgtgcct 1080
acagagcagc cgactgcaat ttctaatacca gaagagatcc caagaactga ggaagtttca 1140
catactcaag ttacctatgg ctccattcaa gataagaaac gtactgcctc tttagaaaaa 1200
cctatgagac gacagacaag aaatcagaca aaggaattag attcttgaaa tgtagtccgt 1260
aattttataa gatattcatt tacatacgcc atctacagca ttattcaaat ctactcatct 1320
atatgtatta ccgttttgta tgataatact ttccatgaca tgctcgcgtg aaaaaacagc 1380
atgagaaaaa gaggatcgca ataagaagac acgtaaatat ctaaataa 1428

8 2/8 2

<210> 63

<211> 133

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

 $\langle 220 \rangle$

<221> terminator

⟨222⟩ (1).. (133)

<400> 63

taacacacca tccacatttc catgtagttc gtatacaaac cctaccagta aaataaaatt 60

aactcctatg tgctttaaat aaaaattata aaccgcctcc aatagttgac gtagtcaggc 120

atgaaagtgc tac 133

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/37, 16/14, G01N33/15, 33/50, A61K39/395, 45/00, 31/4355, 31/4365, 31/437, 31/44, 31/472, 31/4725, 31/5377, A61P31/10, C07D213/16, 213/61, 213/65, 213/69, 213/74, 217/18, 217/20, 401/10, 401/12, 405/06, 405/10, 405/12, 471/04, 491/048, 491/056, 495/04, 498/04, 513/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/37, 16/14, G01N33/15, 33/50, A61K39/395, 45/00, 31/4355, 31/4365, 31/437, 31/44, 31/472, 31/4725, 31/5377, A61P31/10, C07D213/16, 213/61, 213/65, 213/69, 213/74, 217/18, 217/20, 401/10, 401/12, 405/06, 405/10, 405/12, 471/04, 491/048, 491/056, 495/04, 498/04, 513/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T. Miosga et al., "Sequence Analysis of a 33.1 kb Fragment from the Left Arm of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Chromosome X, Including Putative Proteins with Leucine Zippers, a Fungal Zn(II) ₂ -Cys ₆ Binuclear Cluster Domain and a Putative α 2-SCB- α 2 Binding Site", Yeast, Vol.11, pages 681 to 689, (1995), the whole document	1-11
X	US 4013666 A (G. D. Searle & Co.), 22 March, 1997 (22.03.97), Claims; working example, etc. (Family: none)	15-22
X	WO 00/01387 A1 (Celgro, a division of Cellegene Corporation), 13 January, 2000 (13.01.00), Claims; working example, etc. & AU 9948491 A	15-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 September, 2001 (25.09.01)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2001 (02.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05899

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 23 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 12-14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Although the statement in the description is taken into consideration, it is unknown what particular compounds are involved in the scope of the "compound having an antifungal effect" and the "antifungal agent" as described in the above claims. Thus, no international search can be practiced on the above claims.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/37, 16/14, G01N33/15, 33/50, A61K39/395, 45/00, 31/4355, 31/4365, 31/437, 31/44, 31/472, 31/4725, 31/5377, A61P31/10, C07D213/16, 213/61, 213/65, 213/69, 213/74, 217/18, 217/20, 401/10, 401/12, 405/06, 405/10, 405/12, 471/04, 491/048, 491/056, 495/04, 498/04, 513/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/37, 16/14, G01N33/15, 33/50, A61K39/395, 45/00, 31/4355, 31/4365, 31/437, 31/44, 31/472, 31/4725, 31/5377, A61P31/10, C07D213/16, 213/61, 213/65, 213/69, 213/74, 217/18, 217/20, 401/10, 401/12, 405/06, 405/10, 405/12, 471/04, 491/048, 491/056, 495/04, 498/04, 513/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	T. Miosga et al., "Sequence Analysis of a 33.1 kb Fragment from the Left Arm of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Chromosome X, Including Putative Proteins with Leucine Zippers, a Fungal Zn(II) ₂ -Cys ₆ Binuclear Cluster Domain and a Putative α 2-SCB- α 2 Binding Site" Yeast, Vol. 11, p. 681-689 (1995), 文献全体参照	1-11
X	US 4013666 A, (G.D. Searle & Co.), 22. 3月. 1977 (22. 03. 97), 特許請求の範囲、実施例等参照, (ファミリーなし)	15-22
X	WO 00/01387 A1, (CELGRO, a division of CELEGENE CORPORATION), 13. 1月. 2000 (13. 01. 00), 特許請求の範囲、実施例等参照, & AU 9948491 A	15-22

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 09. 01

国際調査報告の発送日

02.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項23は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 12-14 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載の「抗真菌作用を有する化合物」及び「抗真菌剤」について、明細書の記載を参酌しても、具体的にはどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。